Aus dem Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen
der Universität Göttingen

DER EINFLUSS LANGFRISTIGER VERDUNKLUNG AUF DIE $^{14}CO_2$-FIXIERUNG UND DIE VERTEILUNG MARKIERTER METABOLITE IN ISOLIERTEN CHLOROPLASTEN UND IN BLÄTTERN VON SPINACIA OLERACEA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Vorgelegt von

Götz Krapf
aus Weinböhla bei Dresden

Göttingen 1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0081

Aus dem Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen
der Universität Göttingen

DER EINFLUSS LANGFRISTIGER VERDUNKLUNG AUF DIE $^{14}CO_2$-FIXIERUNG UND DIE VERTEILUNG MARKIERTER METABOLITE IN ISOLIERTEN CHLOROPLASTEN UND IN BLÄTTERN VON SPINACIA OLERACEA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Vorgelegt von

Götz Krapf
aus Weinböhla bei Dresden

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D7

Referent: Professor Dr. G. Jacobi

Korreferent: Professor Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 7. 1974

Inhaltsverzeichnis

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen..... 1

I. Einleitung..... 2

II. Material und Methodik..... 5

III. Ergebnisse..... 17

1. Die CO_2-Fixierung und das Fixierungsmuster isolierter Chloroplasten..... 17

1.1. Einfluß der Vorbelichtung des Blattmaterials auf die Kinetik der CO_2-Fixierung..... 18

1.2. Einfluß des pH-Wertes des Mediums auf die CO_2-Fixierung von Chloroplasten aus Kontrollmaterial und aus langfristg verdunkelten Pflanzen..... 21

1.3. Die zeitliche Veränderung der CO_2-Fixierung von Chloroplasten während der langfristigen Verdunklung der Pflanzen..... 24

1.4. Die Markierungsmuster und die Kinetik der Markierungsverteilung..... 26

1.5. Der Einfluß der Verdunklungsdauer der Pflanzen auf die Aktivitätsverteilung. 30

Seite

1.6. Die Regeneration und der Einsatz von Inhibitoren der Proteinsynthese... 31

1.7. Die Abhängigkeit der Markierungsverteilung vom pH-Wert des Reaktionsmediums..... 34

1.8. Die CO_2-Fixierung und die Markierungsverteilung bei Chloroplasten ohne Vorbelichtung der Blätter. Das Problem der Lichtaktivierung..... 38

2. Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf die CO_2-Assimilation in intakten Blattgeweben..... 40

2.1. Das Markierungsmuster intakter Blattstücke im Vergleich zum Fixierungsmuster isolierter Chloroplasten..... 41

2.2. Das Markierungsmuster von Blattstücken aus verdunkelten Pflanzen..... 45

2.3. Kinetik der Markierungsverteilung bei Blattstücken des Kontroll- und des verdunkelten Materials..... 45

2.4. Der Einfluß der CO_2-Konzentration auf die Markierungsverteilung..... 48

2.5. Die CO_2-Fixierung infiltrierter Blattstücke ohne untere Epidermis..... 51

Seite

2.6. Die Fixierungsrate von Blattstücken im Dunkeln..... 53

3. Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf Enzymaktivitäten unter besonderer Berücksichtigung der Lokalisation in der Zelle..... 54

3.1. Der Einfluß der Verdunklung auf die Bezugsgröße..... 54

3.2. Der Einfluß der Verdunklung auf die Aktivität der RuDP-Carboxylase als Leitenzym der Chloroplasten..... 57

3.3. Der Einfluß der Verdunklung auf die Aktivität der PEP-Carboxylase..... 59

3.4. Der Einfluß der Verdunklung auf die Aktivität einiger Glykolyse-Enzyme.... 64

3.5. Der Einfluß der Verdunklung auf die Aktivität von zwei peroxisomalen Enzymen..... 65

IV Diskussion 66

V Zusammenfassung 79

VI Literaturverzeichnis 81

Anhang

Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bicin	N,N-Bis (2-hydroxyäthyl)-Glycin
Chl.	Chlorophyll
D	verdunkeltes Material
d	Tag
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DTT	Dithioerythreitol
EDTA	Äthylen-diamin-tetraessigsäure
FDP	Fruktose-1,6-diphosphat
FDPase	Fruktose-1,6-diphosphatase
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G-6-P	Glukose-6-phosphat
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsr.
K	Kontrollmaterial
MDH	Malat-Dehydrogenase
MES	Morpholinoäthansulfonsäure
NADH/NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid/ -phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGM	Phosphoglyceromutase
3-PGS	3-Phosphoglycerinsäure
POPOP	2,2'-p-Phenylenbis(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Pyr.-Kin.	Pyruvat-Kinase
R-5-P	Ribose-5-phosphat
RuDP	Ribulose-1,5-diphosphat
UDPG	Uridin-5'-diphosphoglukose
Z-D-P	Zuckerdiphosphate
Z-M-P	Zuckermonophosphate

Weitere Abkürzungen werden unmittelbar im Text erklärt.

I. Einleitung

Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf den Stoffwechsel höherer Pflanzen wurde häufig beschrieben. Da der Metabolismus des verdunkelten Blattes in vieler Hinsicht Parallelen zu alternden Blättern aufweist, können diese Versuche auch zur Klärung von Stoffwechselumstellungen während der Seneszenz beitragen (Zusammenfassung der älteren Literatur bei McKee, 1958; Mothes, 1960; Yemm, 1965; Martin und Thimann, 1972; Peterson et al., 1973; Macnicol, 1973; Zucker, 1972).

Im Vordergrund des Interesses standen bei den Verdunklungsversuchen vor allem Probleme des Proteinabbaues und der Resynthese nach Wiederbelichtung. Unter dem Aspekt der Kompartimentierung des Zellstoffwechsels stellt sich jedoch die Frage nach der Änderung des Enzymmusters in subzellulären Bereichen. Die Mehrzahl der publizierten Ergebnisse läßt aber nur eine begrenzte Aussage über verdunklungsbedingte Aktivitätsänderungen von Enzymen zu, deren Lokalisation bekannt oder durch Verwendung von isolierten Organellen festgelegt ist. Lediglich in Arbeiten von Postius (1971, 1972 a, b) wurde über den Einfluß der Verdunklung auf Reaktionen des Elektronentransportes in isolierten Chloroplasten berichtet. In Weiterführung wurden mit der vorliegenden Arbeit diese Untersuchungen auf Reaktionen des reduktiven Pentosephosphatzyklus ausgedehnt.

Wie insbesondere die Arbeiten von Zucker (Zusammenfassung 1972) zeigen, wird eine sehr schnelle Umstellung des Stoffwechsels erzielt, wenn isolierte Blätter verdunkelt werden. Ein Nachteil bei der Verwendung von abgeschnittenen Blättern besteht aber darin, daß der Transport von Intermediaten und Hormonen innerhalb der Pflanze unterbrochen ist,

was sich auf die Metabolitkonzentration und auf den Umsatz auswirken kann (Yemm, 1965). Aus diesem Grunde wurden in den hier beschriebenen Untersuchungen grundsätzlich Blätter von verdunkelten Pflanzen verwendet.

Um eine Störung in einem bestimmten Abschnitt der CO_2-Assimilation zu lokalisieren, wurde der Einbau von $^{14}CO_2$ und die Markierungsverteilung verfolgt. Gegenüber einer mehr willkürlichen Aktivitätsmessung verschiedener Enzyme in Extrakten hat dieses Verfahren den Vorteil, daß der Umsatz im Kompartiment oder in der Zelle erfaßt wird und auf Grund eines veränderten Musters eine gezielte enzymatische Analyse angeschlossen werden kann. Generell sollte sich bei der Betrachtung einer Reaktionskette die eingeschränkte Aktivität eines bestimmten Enzyms in einem Anstau des Substrates und in einer verminderten Markierung der Folgeprodukte äußern.

Derartige Korrelationen zwischen Einbaukinetik und verändertem Enzymmuster lassen sich aber im Bereich der CO_2-Fixierung nur ableiten, wenn die Experimente unter bestimmten Bedingungen durchgeführt werden. Bei Verwendung isolierter Chloroplasten zeigen sich Induktionsphänomene, die sich in einer lag-Phase des CO_2-Einbaus äußern und die durch eine Vorbelichtung der Blätter eliminiert werden können (Walker, 1973). Als Grund für die Induktionserscheinungen können Lichtaktivierungen bestimmter Enzyme (Preiss und Kosuge, 1970) sowie veränderte Metabolitkonzentrationen verantwortlich gemacht werden. Da diese Induktionsphänomene die durch langfristige Verdunklung bewirkten Veränderungen von Enzymaktivitäten überdecken können, ist es erforderlich, das Material durch eine Vorbelichtung in den steady state zu bringen.

Da a priori nicht vorausgesagt werden kann, in welchen Zellräumen ein verstärkter Abbau von Proteinen und enzymatischen Aktivitäten einsetzt, wurde im weiteren die CO_2-Fixierung von Blattstücken in die Untersuchungen mit einbezogen. Durch Versuche mit intakten Zellen bietet sich die Möglichkeit, den Weg der in den Chloroplasten synthetisierten Produkte in anderen Zellräumen zu verfolgen. Die durch die Verdunklung verursachten Änderungen in der Markierungsverteilung konzentrierten das Interesse auf wenige Enzyme, deren gemessene Aktivitäten im Zusammenhang mit ihrer Kompartimentierung die Möglichkeit gaben, die Unterschiede in der Markierung zu deuten.

II. Material und Methodik

Anzucht des Pflanzenmaterials

Die Kultur des Spinats (Spinacia oleracea L. Sorte Matador) erfolgte in einem Kulturraum auf Einheitserde bei einem Licht-Dunkelwechsel von 12 : $\overline{12}$ h und einem Temperaturwechsel von 18 : 12°C. Die Pflanzen wurden mit 1000 W Hg-Hochdrucklampen belichtet. Eine Zusatzbelichtung mit Glühbirnen sorgte für eine Erhöhung des Rotanteils. Die Beleuchtungsstärke betrug 20-bis 25000 Lux. Für die Versuche wurde 8 bis 10 Wochen alter Spinat verwendet. Um tagesperiodische Schwankungen auszugleichen, erfolgte die Ernte normalerweise in der Mitte der Lichtperiode. Zur Verdunklung wurden Kulturkästen aus der Dunkelphase in einen Dunkelraum gebracht. Die Temperatur betrug 18 ± 1°C, die relative Luftfeuchte lag in Bereich von 60 %.

Chlorophyllbestimmung

Nach Extraktion des Chlorophylls mit 80 %igem Aceton wurde nach Arnon (1949) die Extinktion bei 645 und 663 nm bestimmt und daraus auf den Chlorophyllgehalt der Chloroplastensuspension geschlossen.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der zentrifugierten Rohextrakte erfolgte nach Lowry (1951) mit dem Folin-Ciocalteus-Reagenz. Um eine Störung der Bestimmung durch DTT und HEPES weitgehend auszuschalten, wurde nach der ersten $HClO_4$-Fällung der Proteine das dekantierte Sediment erneut mit 4 %iger $HClO_4$ aufgenommen und gründlich gewaschen. Die Bestimmung wurde durch PVP nicht beeinträchtigt.

Radioaktivitätsbestimmungen

Zur Bestimmung der Radioaktivität im Flüssigkeits-szintillationszähler wurde folgendes Szintillations-medium verwendet:

1 Teil Methanol
1 Teil Toluol
2,0 g PPO/Liter
0,25 g POPOP/Liter

Im genannten Medium konnten mit 10 ml bis 0,3 ml wässrige Probe aufgenommen und gezählt werden.
Zur Zählung wurden benutzt: Mark I (Nuclear Chicago)
Betaszint 5000 (Berthold-Frieseke)
Zur Quenchkorrektur wurde die Kanalverhältnismethode mit und ohne externe Standardisierung verwendet.

Chloroplastenisolation

a) Isolation ohne Vorbelichtung der Blätter unmittelbar vor der Präparation:
Blätter des Kontrollmaterials wurden bei normalem Tageslicht mit entionisiertem Wasser gewaschen, entrippt und zur Vorkühlung im Dunkeln in einem Kühlraum bei 0°C 15 Minuten aufbewahrt. Der Aufschluß der Blätter erfolgte mit den bei Jensen und Bassham (1966) angegebenen Medien: der pH-Wert des Aufschluß-mediums wurde in Abänderung auf pH 6,3 eingestellt. 10 g Blattmaterial wurden mit 40 ml angefrorenem Isolationsmedium in einem Mörser mit Plexigum (1 - 3 mm) genau 25 Sekunden zerrieben. Das Homogenat wurde anschließend sofort über Watte und Mull abgepreßt und bei 1200 g für 90 Sekunden zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde sorgfältig dekantiert und die Chloroplasten mit 1 ml Suspensionsmedium aufgerührt. Zwischen

Präparationsbeginn und Aufnahme im Suspensionsmedium vergingen 4 Minuten. Bis zur CO_2-Fixierung blieben die Chloroplasten im Eisbad. Beim verdunkelten Pflanzenmaterial wurden alle Vorbereitungen bis zur Isolation unter Lichtausschluß durchgeführt.

b) Isolation mit Vorbelichtung der Blätter unmittelbar vor der Präparation:
Die Blätter des Kontrollmaterials und der verdunkelten Pflanzen wurden bei 15°C zur Temperaturkonstanz in einem flachen Wasserbad ausgebreitet und mit einer 150 Watt Photolampe 15 bis 30 Minuten belichtet. 5 bis 8 Sekunden nach dem Ende der Vorbelichtung wurden die Blätter wie oben geschildert aufgeschlossen.

CO_2-Fixierung isolierter Chloroplasten

20 Minuten nach der Präparation wurden 100 µl Chloroplastensuspension und 900 µl Reaktionsmedium bei 0°C in 5-ml-Schnappdeckelglasgefäßen gemischt. Die Gefäße wurden mit Serumkappen verschlossen und im Dunkeln in eine Warburg-Apparatur eingesetzt. Nach einer 40 Sekunden dauernden Temperaturadaptation bei 20°C wurde mit Weißlicht bei einer Lichtintensität von $1{,}2 \times 10^5$ erg/cm^2 s belichtet. Zu bestimmten Zeiten wurden mit einer Mikrospritze 100 µl des Reaktionsgemisches durch die Serumkappe abgenommen und in 0°C kaltes Methanol (100 bzw. 150 µl) gespritzt. 50 µl der abgestoppten Chloroplastenextrakte wurden zur Bestimmung der säurestabilen Radioaktivität auf ein mit 1N HCl getränktes Filterpapier in einem Szintillationszählgefäß gespritzt. Nach 6 Stunden Aufbewahrung im laufenden Abzug war das gesamte nichtfixierte CO_2 ausgetrieben.

Die Fixierungsrate der Chloroplasten wurde bei bekannter Chlorophyllkonzentration und spezifischer Aktivität des eingesetzten $H^{14}CO_3^-$ (zwischen 5 und 15 /u Ci / /u mol HCO_3^-) stets aus der entsprechenden Fixierungskinetik berechnet. Bei unterschiedlichen lag-Phasen des CO_2-Einbaus bei verschiedenen Präparationen wurde so stets die Maximalrate der CO_2-Fixierung ermittelt.

Bei der Berechnung der Fixierungsrate wurde eine Verdünnung der spezifischen Aktivität durch CO_2 aus der Luft nicht berücksichtigt. Da nach Angaben von Bassham et al. (1974) unter den angewendeten Pufferbedingungen eine Verdünnung der spezifischen Aktivität von ca. 10 % möglich ist, könnten die tatsächlichen Fixierungsraten etwa um 10 % höher liegen.

Wurden die CO_2-Fixierungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, dann wurde im Bereich von 6,7 bis 8,0 mit HEPES, im Bereich oberhalb 8,0 mit Bicin gepuffert. Vorversuche ergaben bei gleichen pH-Werten keinen signifikanten Unterschied zwischen HEPES und Bicin.

Markierung von Blattstücken mit $^{14}CO_2$ in der Gasphase

Für die Markierungsversuche mit Blattstücken in der Gasphase wurde die in Abbildung 1 dargestellte Photosynthesekammer verwendet. Die Kammer hatte ein Innenvolumen von 125 ml und bestand aus Plexiglas. Sie wurde mit einer 150 Watt Photolampe gleichmäßig belichtet; ein KG-3 Wärmeschutzfilter (Schott und Gen. Mainz) verhinderte eine Temperaturerhöheung in der Kammer. Die Belichtungsintensität betrug ohne Wärmestrahlung 55 bis 65 x 10^3 erg/cm^2 s. An ihrer Vorderfront hatte die Kammer 5 Öffnungen, in die mit zwei Plastikstäben versehene Gummistopfen paßten. An die Kammer ange-

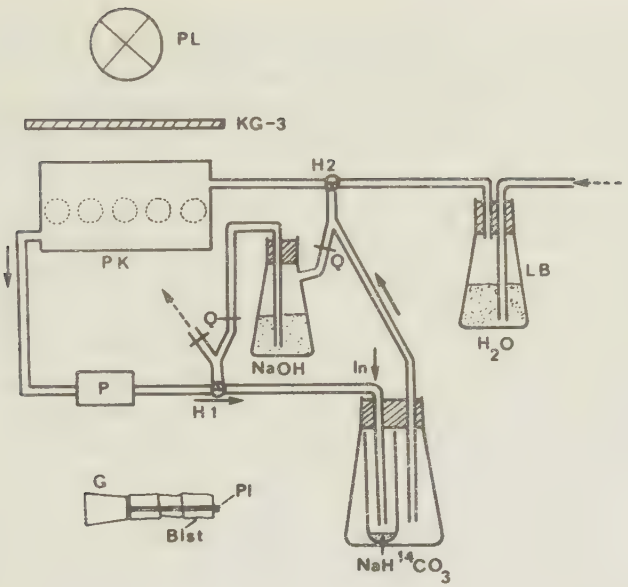

Abb. 1

Apparatur zur CO_2-Fixierung von Blattstücken
Es bedeuten: PK = Photosynthesekammer, PL = Photolampe, KG-3 = Wärmeschutzfilter, H 1, H 2 = Drei-Wegehähne, Q = Quetschhähne, P = Membranpumpe, LB = Gefäß zur Luftbefeuchtung, In = Injektionsstelle für verdünnte Säure zur Freisetzung von CO_2, G = Gummistopfen, Blst = Blattstück, Pl = Plastikstab.
Die gestrichelten Pfeile zeigen den Verlauf des Gasstroms (offen) während der Vorbelichtung, die durchgezogenen Pfeile geben die Begasung bei der $^{14}CO_2$-Markierung an. Die Waschflasche mit NaOH wurde bei Versuchen mit niedrigen CO_2-Konzentrationen benutzt. Außerdem konnte überschüssiges $^{14}CO_2$ am Versuchsende aufgefangen werden. Die Nebenskizze zeigt die Befestigung der Blattstücke in der Halterung aus Gummistopfen und Plastikstäben.
Weitere Angaben - siehe Text.

schlossen waren verschiedene Begasungseinrichtungen. Bei entsprechender Einstellung der 3-Wegehähne 1 und 2 konnte ein offener Gaskreislauf vom Luftbefeuchtungsgefäß über die Kammer und die Pumpe (Membranpumpe, Typ Wisa 600, maximale Pumpleistung: 600 Liter Luft/ h) nach außen erfolgen. Wurden die 3-Wegehähne umgestellt, so wurde Gas aus dem CO_2-Entwicklungsgefäß in die Kammer und wieder zurück gepumpt. Das gesamte Gasvolumen betrug in diesem Fall 550 ml. Bei einem Fixierungsexperiment wurden passende Blattstücke aus den mittleren Spreitenbereich verschiedener Blätter ausgeschnitten, zwischen die Plastikstäbe der Gummistopfen geklemmt und in die Kammer eingesetzt. Pro Halterung konnten 200 bis 250 mg Blattmaterial befestigt werden.

Um kurzfristige Induktionsphänomene der Photosynthese, wie sie z. B. von Rabinowitch (1956) und Walker (1973) beschrieben wurden, auszuschalten und $^{14}CO_2$ den Blattstücken im steady state anzubieten, wurden die Blattstücke stets 15 Minuten vorbelichtet und mit angefeuchteter Luft begast (offener Gaskreislauf). Die Temperatur lag während der Versuche zwischen 23 und 25°C.

Bereits zur Vorbelichtungsphase wurde verdünnte H_2SO_4 durch den Siliconschlauch injiziert und das CO_2 im Entwicklungsgefäß freigesetzt. Zu Beginn der $^{14}CO_2$-Markierung wurde zunächst Hahn 1 und anschließend Hahn 2 umgestellt und damit die Markierung gestartet. Am Versuchsende wurden die Gummistopfen mit den Blattstücken herausgenommen und sofort in flüssigen Stickstoff getaucht. Bei Versuchen mit sehr niedrigen CO_2-Konzentrationen wurde während der Vorbelichtung die Luft im geschlossenen Gaskreislauf durch eine

Spülung mit NaOH CO_2-frei gehalten. Um Luft-CO_2 bei diesen Experimenten weitgehend auszuschließen, wurde in diesem Fall ein CO_2-Entwicklungsgefäß mit stark vermindertem Volumen verwendet. Die spezifischen Aktivitäten des angebotenen CO_2 lagen im Bereich von 20 /u Ci/ /u mol CO_2. Sie errechneten sich aus der eingesetzten $H^{14}CO_3^-$-Menge und dem CO_2-Gehalt des Apparaturvolumens.

Markierung von infiltrierten Blattstücken mit $^{14}CO_2$

Um die Spaltöffnungen als mögliche Diffusionsbarriere auszuschalten, wurde die untere Epidermis im mittleren Blattbereich vorsichtig abgezogen. Mit einem Korkbohrer wurden dann Blattstücke von ca. 55 mg Frischgewicht ausgestanzt. Eine Austrocknung des Materials während des Versuchs konnte durch eine Vakuuminfiltration der Blattstücke mit 0,3 M Sorbitlösung verhindert werden. Anschließend wurden die Blattstücke in 2 ml 0,3 M Sorbit (0,05 M HEPES; pH 7,8) gegeben und bei 25°C in 5-ml-Schnappdeckelgefäßen bei leichtem Schütteln 15 Minuten vorbelichtet. Zu Beginn der Markierung wurden 50 /uCi $NaH^{14}CO_3$ mit einer spezifischen Aktivität von 60 mCi/mmol eingespritzt. Zu bestimmten Zeiten wurde das Material mit einer Pinzette aus der Reaktionslösung genommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Aufschluß der markierten Blattstücke

Zunächst wurden die tiefgekühlten Blattstücke in einem Potter-Elvehjem-Gefäß der Firma Braun-Melsungen staubfein zerrieben und anschließend bei etwa -5°C mit Methanol extrahiert. Dabei erwies sich ein Verhältnis von 1 - 1,2 Teilen Methanol zu 1 Teil Frischgewicht

als günstig. Sehr viel höhere Methanolkonzentrationen führten zu einer verminderten Extraktion der Phosphatester, speziell der Zuckerdiphosphate. Wenn bei kleinen Mengen Frischgewicht zur Extraktion größere Mengen Methanol eingesetzt wurden, dann wurde durch entsprechende Wasserzusätze eine weitgehende Extraktion der markierten Substanzen erzielt. Bis zur chromatographischen Analyse der markierten Substanzen wurde das Homogenat im Kühlschrank unter -10°C aufbewahrt (3 bis 30 Stunden). Zur Bestimmung der Fixierungsrate der Blattstücke wurde die Radioaktivität eines Aliquots des Homogenisats ermittelt. Aus dem Extraktvolumen und der spezifischen Aktivität des eingesetzten $^{14}CO_2$ ließ sich die Rate berechnen. Das Extraktvolumen wurde aus den eingesetzten Mengen Methanol und Frischgewicht kalkuliert.

Auftrennung der löslichen Fixierungsprodukte

Die Auftrennung der markierten Produkte erfolgte nach Schürmann (1969) mittels kombinierter Dünnschichtelektrophorese und Dünnschichtchromatographie auf nativer Celluloseschicht mit EDTA-Zusatz. Aufgetragen wurden je nach Aktivität der zentrifugierten Chloroplasten- und Blattstückextrakte zwischen 5 und 20 µl Extrakt. Bei den Chloroplastenextrakten zeigte sich in Vorversuchen, daß mit 0,3 M HCl abgestoppte Präparationen (1 Teil Chloroplastensuspension + 1 Teil 0,3 M HCl) kein anderes Fixierungsmuster als die mit Methanol abgestoppten Präparationen aufwiesen. In Abänderung ließ sich die Dünnschichtelektrophorese bei 1200 V/40 mA mit einem Hochspannungsgerät der Firma CAMAC auf 20 Minuten verkürzen. Bei Spannungen von 500 bis 600 Volt trat häufig eine Hydrolyse der Phosphatester auf. Es erscheint möglich, daß bei geringen Wanderungsgeschwindigkeiten

in der Anfangsphase der Auftrennung eine methanolstabile Phosphatase, wie sie von Ullrich und Calvin (1962) beschrieben wurde, wirksam wird. Eine Erhöhung von Glycerat und anderen Hydrolyseprodukten der Phosphatester konnte bei den Chloroplastenextrakten erst nach längeren Aufbewahrungszeiten (1 bis mehrere Wochen) nachgewiesen werden. Die Dünnschichtchromatographie wurde nur einmal bei $0^{\circ}C$ im Kühlraum durchgeführt.

Identifizierung der aufgetrennten Substanzen

Die Lage der markierten Metabolite auf der Dünnschichtplatte wurde mittels Autoradiographie ermittelt. Als sehr empfindlicher Röntgenfilm erwies sich dabei Kodirex von Kodak. Normalerweise betrug die Expositionszeit (die Filme mit den Platten wurden bei $0^{\circ}C$ aufbewahrt) zwischen 1 und 3 Wochen. Die Identifizierung erfolgte nach den Angaben von Schürmann (1969), Schürmann et al. (1972), Ries und Metzner (1971), Döhler (1972). Zur Sicherstellung wurden stärker markierte Substanzen vom Chromatogramm abgekratzt, mit Wasser eluiert und mit Vergleichssubstanzen cochromatographiert. Die Identität der Zuckerphosphate wurde ferner durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften bei saurer bzw. alkalischer Hydrolyse bestimmt. Zum Nachweis der Vergleichssubstanzen, wie Phosphatester, Aminosäuren und Fettsäuren auf den Cochromatogrammen wurden die in Stahl (1967) angegebenen Sprühreagentien verwendet. Zur Identifizierung von Äpfelsäure, Citronensäure und Glycerinsäure wurden den Extrakten bestimmte Mengen an markierten Vergleichssubstanzen zugesetzt und die Lokalisation bestimmt. Äpfelsäure und Citronensäure wurden von Amersham-Buchler/Braunschweig bezogen,

Glycerinsäure wurde aus markierter 3-PGS durch enzymatische Hydrolyse gewonnen. Nach Bestimmung der Lage der Markierung wurden die Aktivitäten mit einem feinen Spatel abgekratzt und im Szintillationszähler gemessen.

Rohextraktpräparation zur Messung von Enzymaktivitäten

Die Extraktion der Enzyme erfolgte in Anlehnung an Ting und Osmond (1973 a). 10 g entrippte und mit deionisiertem Wasser gewaschene Blätter wurden mit Filterpapier getrocknet und grob zerkleinert. Bei 0°C wurde das Blattmaterial mit 30 ml Aufschlußmedium in einem Homogenisator der Firma Bühler 10 Sekunden bei maximaler Tourenzahl zerkleinert.
Das Aufschlußmedium hatte folgende Zusammensetzung:

0,1	M	HEPES , pH 7,8
0,002	M	DTT
1 %		PVP

Ein EDTA-Zusatz (2 mM) hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der Enzyme und wurde daher ausgelassen. Zum Vergleich wurden Rohextrakte mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator bereitet. Wesentliche Unterschiede zeigten sich nicht. Im Anschluß an die Präparation wurde das Homogenisat über Mull filtriert und bei 0°C 20 Minuten bei 25000 g zentrifugiert, der klare Überstand im Eisbad aufbewahrt und für die Enzymteste eingesetzt.

Zur Chlorophyllbestimmung wurde aus dem nicht zentrifugierten Homogenat ein Aliquot abgenommen und wie die Chloroplastensuspension behandelt.

Die Messung der Enzymaktivitäten

In der Regel wurden die enzymatischen Aktivitäten mit

den im Anhang beschriebenen Testen gemessen. Für den optischen Test stand ein Spektralphotometer (PMQ II, Zeiss) mit Küvettenautomatik und Vielkanalschreiber (Polycomb, Hartmann & Braun) für Paralleltests zur Verfügung. Wie bei allen anderen Enzymtesten wurde bei 25°C gearbeitet.

Die PEP-Carboxylase wurde außerdem bei Kontrollmaterial und 8 Tage verdunkelten Pflanzen über den Einbau von ^{14}C-markiertem HCO_3^- in säurestabile Verbindungen getestet. Die Messung erfolgte mit und ohne Kopplung der MDH-Reaktion. Bei Auslassung von NADH- und MDH-Zusätzen wurde die gebildete Oxalessigsäure mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin in das entsprechende säurestabile Osazon überführt, Coombs et al. (1973a). Bis auf NADH und MDH hatten die Teste die gleiche Zusammensetzung wie im optischen Test. Da in den getesteten Rohextrakten bereits eine hohe endogene MDH-Aktivität vorhanden war, lag bei diesen Messungen der wesentliche Unterschied beim NADH-Zusatz. Die Austreibung des nicht eingebauten HCO_3^- ist beim RuDP-Carboxylase-Test beschrieben.

Messung enzymatischer Aktivitäten nach einer Reinigung des Rohextraktes

Um die Enzymaktivitäten unabhängig von niedermolekularen Begleitsubstanzen bestimmen zu können, wurden in einem Fall die Aktivitäten mit gereinigten Extrakten getestet. Bei 0°C wurden 0,5 ml Rohextrakt auf eine Sephadex G-25 Säule (14 cm x 1 cm) gegeben. Das Gel war mit 0,05 M HEPES; pH 7,8 und 3 mM DTT äquilibriert worden. Für die Enzymteste wurde die erste Fraktion mit einer Absorption bei 280 nm verwendet. Die

Reinigung wurde an einem Kontrollextrakt und einem Extrakt aus 8 Tage verdunkeltem Spinat durchgeführt.

Für die getesteten Enzyme ergab sich, daß die Unterschiede zwischen K und D durch die Reinigung nicht wesentlich verändert wurden. Bei der Pyruvat-Kinase und vor allem der PEP-Carboxylase zeigte sich jedoch nach dem Reinigungsschritt eine verminderte Aktivität. So betrug die spezifische Aktivität der PEP-Carboxylase nach der G-25-Filtration nur noch 1/3 der Ausgangsaktivität. Dieser Aktivitätsverlust ließ sich nicht durch Zusätze von G-6-P, einem von Coombs et al. (1973 a) beschriebenen Aktivator der PEP-Carboxylase, einer C_4-Pflanze, rückgängig machen.

Chemikalien

Die meisten Biochemikalien stammten von Boehringer & Söhne, Mannheim; RuDP von Sigma Chem. C., St. Louis, USA; Lincomycin von Hoechst in Hoechst; HEPES, MES, Bicin, D-threo-Chloramphenicol von Serva, Heidelberg; PPO, POPOP von W. Zinsser, Frankfurt; Sephadex G-25 von Pharmacia, Upsalla, Schweden; Radiochemikalien von Amersham-Buchler, Braunschweig; alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

III. Ergebnisse

III.1. Die CO_2-Fixierung und das Markierungsmuster isolierter Chloroplasten

Die Prinzipien der CO_2-Assimilation waren durch die grundlegenden Arbeiten an einzelligen Algen bereits vor über 20 Jahren geklärt (Bassham und Calvin, 1957). Trotz einer Fülle von Publikationen sind aber bis heute Fragen nach dem Mechanismus und der Regulation im Bereich der Intermediärstufen sowie den Beziehungen zwischen den Chloroplasten und den übrigen Zellräumen noch offen (Bassham, 1971). Allgemein werden für das Studium dieser Probleme isolierte Zellorganelle oder hochgereinigte Enzyme herangezogen, mit denen die regulativen Parameter für eine Reaktionskette oder für eine spezielle Reaktion erfaßt werden. Der Grund für die Unklarheiten bei der CO_2-Assimilation liegt vor allem darin, daß isolierte Chloroplasten hinsichtlich der CO_2-Fixierung nicht immer reproduzierbare Ergebnisse liefern und weiterhin ein von intakten Zellen und Blättern abweichendes Fixierungsmuster aufweisen.

Obwohl mit der Einführung besonderer Isolationsmedien durch Walker (1964) und durch Jensen und Bassham (1966) die Präparation weitgehend intakter Chloroplasten mit hohen Fixierungsraten ermöglicht wurde, sind die von verschiedenen Arbeitsgruppen beschriebenen Werte recht unterschiedlich. Bei der Durchsicht der Literatur wird deutlich, daß nur in seltenen Fällen die von Jensen und Bassham (1966) angegebenen Raten von 150 $/u$ mol CO_2/mg Chl. x h erreicht werden. In der Mehrzahl der Arbeiten variieren die Raten trotz Verwendung gleicher Medien für den Spinatchloroplasten zwischen 30 und 100 $/u$ mol CO_2/mg Chl. x h.

Neben Variationen im Pflanzenmaterial, die vor allem durch unterschiedliche Anzuchtbedingungen gegeben sind, spielt die Behandlung der Blätter vor der Isolation genauso eine Rolle wie spezielle "Kunstgriffe" bei der Isolation und während des Versuchsablaufes (Walker, 1971).

Insbesondere bei physiologischen Versuchen ist es daher erforderlich, die Behandlung des Kontrollmaterials und die Versuchsbedingungen zu standardisieren. Erst wenn für gewisse Versuchsbedingungen bestimmte Charakteristika des Materials erarbeitet sind, wird es möglich sein, den Änderungen des physiologisch variierten Pflanzenmaterials eine Signifikanz zuzusprechen. In den folgenden Abschnitten wird daher zunächst über die Optimierung des Kontrollmaterials im Hinblick auf die Aktivität der Chloroplasten berichtet.

III.1.1. Einfluß der Vorbelichtung des Blattmaterials auf die Kinetik der CO_2-Fixierung.

Bei Untersuchungen über die CO_2-Fixierung an isolierten Chloroplasten spielt die Vorbehandlung der geernteten Blätter eine größere Rolle als bei Versuchen über den Elektronentransport und über die Phosphorylierung. Voraussetzungen für eine optimale CO_2-Fixierung sind vor allem bestimmte endogene Substratkonzentrationen, die eine ausreichende Anlieferung des CO_2-Akzeptors und dessen Vorstufen gewährleisten (Walker, 1973). Hinzu kommt, daß insbesondere für einen Teil der Enzyme des reduktiven Pentosephosphatzyklus Lichtaktivierungen beschrieben wurden (Preiss und Kosuge, 1970), so daß sich deren Zustand ebenfalls auf die Aktivität auswirken kann. Da vor der Präparation

der Chloroplasten die Blätter meist geringeren Lichtintensitäten ausgesetzt sind, kann neben verminderter Enzymaktivität ein Mangel an endogenen Substraten auftreten.

Die Bedeutung der Vorbelichtung (Einzelheiten siehe Material und Methodik) der Blätter auf die Einbaukinetik von $^{14}CO_2$ ist für die isolierten Chloroplasten des Kontrollmaterials in Abb. 2 aufgezeigt. Ohne Vorbelichtung der Blätter setzt die Fixierung erst nach etwa 3 Minuten ein und besitzt über einen Zeitraum von 10 Minuten eine konstante Maximalrate, gefolgt von einem Abfall. Zur Berechnung der Einbaurate werden im hier geschilderten Versuch die Werte zwischen der 5. und 10. Minute herangezogen; es ergibt sich ein Einbau von 42,5 µ mol CO_2/mg Chl. x h. Im Vergleich dazu wird die Verzögerungsphase nahezu eliminiert, wenn die Versuche mit Chloroplasten aus vorbelichteten Blättern durchgeführt werden. Für die parallel aufgearbeitete Präparation betrug die zwischen der 3. und 10. Minute erfaßte Einbaurate 47 µ mol CO_2/mg Chl. x h und lag damit um etwa 10 % höher als bei den Chloroplasten aus nicht vorbelichteten Blättern. Dieser Befund wurde in einer Reihe von Experimenten reproduziert. Die Raten der Chloroplasten aus nicht vorbelichtetem Material erreichten 60 bis 90 % der Werte, die mit Chloroplasten aus vorbelichteten Blättern erhalten wurden. Eine entsprechende Wirkung der Vorbelichtung wird auch von Gibbs et al. beschrieben (1967). Für die Verzögerungsphase wird speziell ein anfänglicher Mangel an R-5-P und RuDP verantwortlich gemacht; eine Zugabe von R-5-P kann die Hemmung des CO_2-Einbaus zu Beginn der Belichtung weitgehend aufheben (Bucke et al., 1966; Jensen und Bassham, 1968).

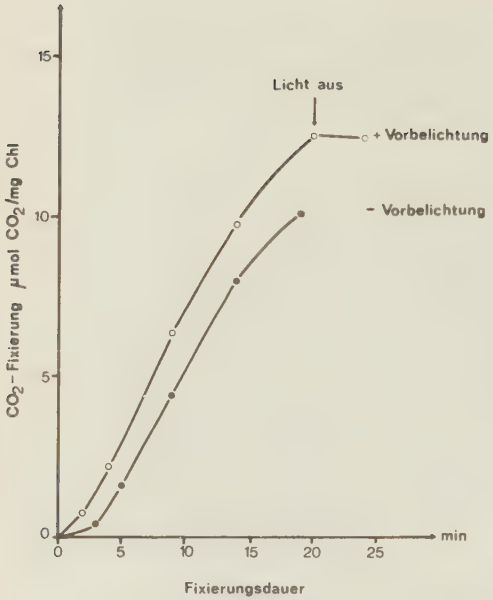

Abb. 2

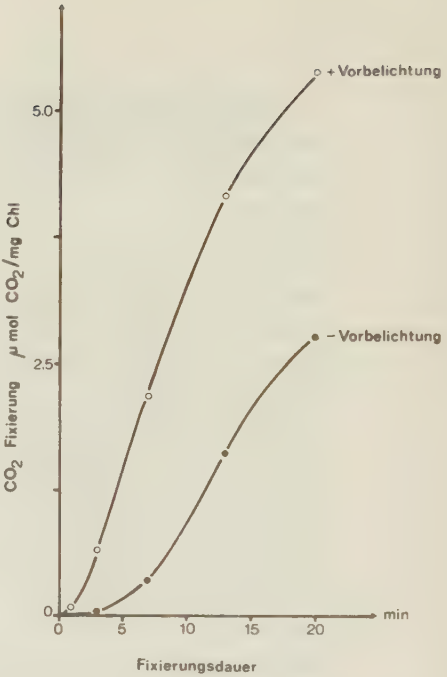

Abb.3

Abb.2

Kinetik der CO_2-Fixierung bei Chloroplasten aus Kontrollmaterial mit und ohne Vorbelichtung der Blätter
Versuchsbeschreibung und Fixierungsraten siehe Text

Abb.3

Kinetik der CO_2-Fixierung bei Chloroplasten aus 7 Tage verdunkeltem Material mit und ohne Vorbelichtung
Versuchsbeschreibung und Fixierungsraten siehe Text

Bei den hier geschilderten Versuchen mit Chloroplasten aus Kontrollmaterial ohne Vorbelichtung wurden die Blätter während der Präparationsvorbereitungen nur kurzfristig in nicht lichtsättigende Bedingungen überführt. Es ist daher zu erwarten, daß die Verzögerungsphase noch stärker zum Ausdruck kommt, wenn langfristig verdunkelte Pflanzen verwendet werden.

Wie in Abb. 3 gezeigt wird, ist dies tatsächlich der Fall. Hier sind die Kinetiken des CO_2-Einbaus für Chloroplasten aus 7 Tage verdunkelten Pflanzen aufgezeichnet. Bei deutlich verlängerten lag-Phasen betragen die Fixierungsraten der Chloroplasten aus nicht vorbelichteten Blättern nur noch 30 bis 60 % der Raten von Chloroplasten aus vorbelichteten Blättern. Im hier dargestellten Versuch lagen die Werte bei 13,5 und 26,2 /u mol fixiertes CO_2/mg Chl. x h. Im verdunkelten Material kann sich ein Proteinabbau mit einer Dunkelinaktivierung von Enzymen und veränderten Konzentrationen endogener Substrate überlagern.

III.1.2. Einfluß des pH-Wertes des Mediums auf die CO_2-Fixierung von Chloroplasten aus Kontrollmaterial und aus langfristig verdunkelten Pflanzen.

Unter Berücksichtigung der für die Maximalgeschwindigkeit erforderlichen Vorbelichtung der Blätter ergab sich bei den Chloroplasten aus 7 Tage verdunkelten Pflanzen ein Abfall in der CO_2-Fixierung um etwa 45 %. Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß der Einbau von $^{14}CO_2$ im Kontrollmaterial und in den Chloroplasten aus physiologisch variierten Pflanzen

unter gleichen Bedingungen gemessen wurde, obwohl nach langfristiger Verdunklung andere Reaktionsoptima nicht ausgeschlossen werden können.

Von entscheidender Bedeutung für die Fixierungskapazität von CO_2 ist vor allem die apparente Protonenkonzentration. Da in der Carboxylierungsreaktion mit RuDP als Substrat CO_2 und nicht HCO_3^- fungiert (Cooper, 1969), wird durch pH-Änderungen auch die Substratkonzentration und damit unter Umständen auch die Geschwindigkeit des Einbaus verändert (Umbreit und Burris, 1964). Weiterhin müssen die unterschiedlichen pH-Optima der einzelnen Enzyme des Zyklus berücksichtigt werden, so daß Aktivitätsänderungen bei pH-Verschiebungen verschiedene Ursachen haben können. Die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen pH-Optima von 7,4 bis 8,5 (Gibbs, 1971; Heldt et al., 1973; Avron und Gibbs, 1974) erklären sich wahrscheinlich aus dieser komplexen Wirkung der Protonenkonzentration. Der physiologische Zustand des Materials soll dabei nach Heldt et al. (1973) eine wesentliche Bedeutung haben.

Um für das hier verwendete Material und vor allem für die Chloroplasten aus verdunkelten Blättern zu einer Optimierung zu kommen, wurde die CO_2-Fixierung in Abhängigkeit vom pH-Wert des Reaktionsmediums genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 und 5 abgebildet.

Übereinstimmend zeigten alle Präparationen ein Optimum bei pH 7,6; zusätzlich tauchte in drei Fällen noch eine Schulter bei pH 8,4 auf. Um bei unterschiedlichen Fixierungsraten verschiedener Präparationen vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Raten

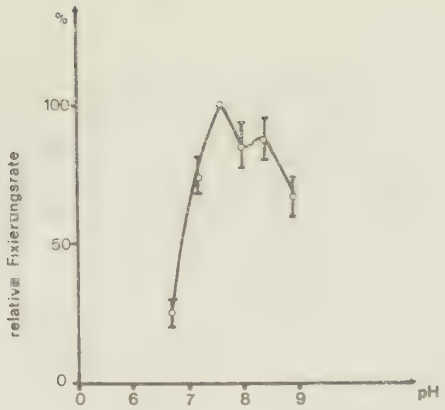

Abb. 4

Einfluß des pH-Wertes im Reaktionsmedium auf die Rate der CO_2-Fixierung bei Chloroplasten aus Kontrollmaterial. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von 4 verschiedenen Chloroplastenpräparationen mit den Standardabweichungen. Weitere Erklärungen siehe Text.

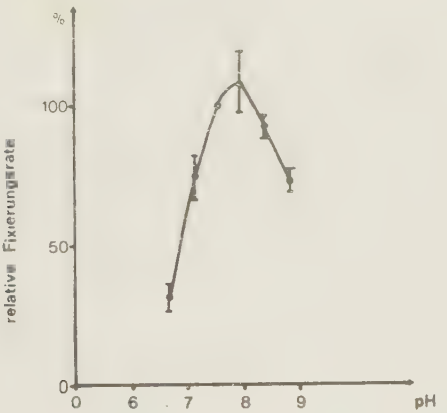

Abb. 5

Einfluß des pH-Wertes im Reaktionsmedium auf die Rate der CO_2-Fixierung bei Chloroplasten aus verdunkeltem Material Weitere Erklärungen siehe Text und Legende zu Abb. 4.

beim pH 7,6 als 100 % gesetzt und die übrigen entsprechend berechnet. In Abb. 4 sind die Mittelwerte aus 4 Kontrollpräparationen mit den Standardabweichungen aufgezeichnet. Vergleichsweise lag das Optimum der CO_2-Fixierung für Chloroplasten aus Blättern von 5 bis 9 Tage verdunkelten Pflanzen bei pH 8,0. Die relativ hohen Standardabweichungen werden in Abb. 4 und 5 nicht durch unterschiedliche pH-Optima innerhalb einheitlicher Versuchsreihen bewirkt, sondern haben ihre Ursache in relativ großen Unterschieden bei Fixierungen im nicht optimalen pH-Bereich.

III.1.3. Die zeitliche Veränderung der CO_2-Fixierung von Chloroplasten während der langfristigen Verdunklung der Pflanzen.

Durch die in den beiden ersten Kapiteln geschilderten Versuche wurden Bedingungen gefunden, unter denen bei dem jeweils verwendeten Material eine Maximalrate erwartet werden kann. Bei Berücksichtigung dieser Optimierung wurde im weiteren die Fixierungskapazität der Chloroplasten kontinuierlich über einen längeren Verdunklungszeitraum der Pflanzen gemessen (Abb. 6). Bei der hier dargestellten Verdunklungsreihe zeigen die Chloroplasten nach 5 Tagen Dunkelheit noch etwa 75 bis 80 % der Aktivität des Kontrollmaterials. Erst nach längeren Verdunklungszeiten kommt es zu einem rascheren Abfall der Fixierungskapazität. Eine Verdunklung von 8 Tagen bewirkt eine Halbierung der Einbaurate, die hier beim Kontrollmaterial zwischen 35,1 und 51,6 /u mol CO_2/mg Chl. x h mit einem Mittelwert von 41,5 /u mol CO_2/mg Chl. x h lag. Überführt man die verdunkelten Pflanzen nach 9 Tagen Verdunklung in den Kulturraum der Kontrollpflanzen mit

normalem Tag-Nacht-Rhythmus, dann zeigt sich nach 3 Tagen eine Regeneration der Fixierungsaktivität. Das verdunkelte Material ist biologisch noch intakt und hat keine irreparablen Schäden durch die Verdunklung erlitten.

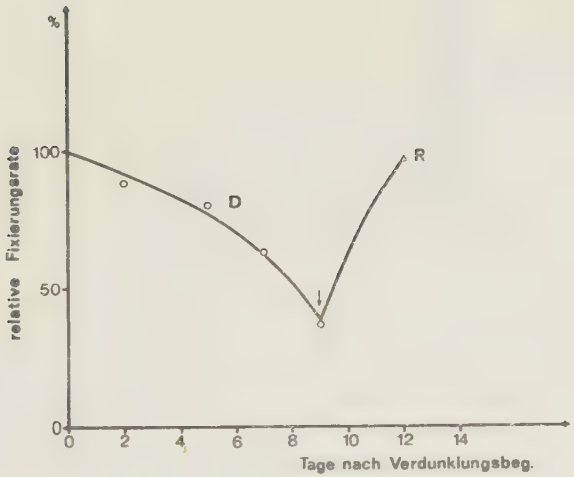

Abb. 6

Einfluß der Verdunklungsdauer auf die CO_2-Fixierung isolierter Chloroplasten
Die Chloroplasten wurden aus vorbelichtetem Material isoliert. Der Pfeil zeigt den Beginn der Regeneration (R).

III.1.4. Das Markierungsmuster und die Kinetik der Markierungsverteilung.

Um spezifischere Informationen darüber zu erhalten, an welchen Stellen der Metabolismus der Chloroplasten aus verdunkeltem Material gehemmt wird, wurde eine Verteilung der radioaktiven Markierung in die einzelnen Metabolite des Chloroplastenstoffwechsels untersucht.

Das in Abb. 14 (siehe S.42) dargestellte Radioautogramm zeigt das bekannte Markierungsmuster für intakte Chloroplasten mit einer starken Fixierung von ^{14}C in 3-PGS und in DHAP und einer geringeren Intensität in den Zuckermono- und diphosphaten sowie im Glykolat. Obwohl die Qualität dieser Markierung sich in den Chloroplasten aus verdunkelten Pflanzen nicht ändert, findet man erhebliche quantitative Unterschiede im Bereich von 3-PGS und DHAP. Wie aus Abb. 7 hervorgeht, sinkt nach 9 Tagen Verdunklung der relative Anteil von 3-PGS um etwa 50 % ab, während DHAP und in geringem Maße die Zuckerdiphosphate hinsichtlich der Markierung ansteigen. Da die hier nach 6,5 Minuten gemessene Markierungsverteilung im Verlauf der Fixierungszeit nicht konstant bleibt, gibt erst die Analyse der Kinetik der Markierungsverteilung für die einzelnen Komponenten einen Aufschluß über die Veränderungen des Umsatzes. Für die wichtigsten Metabolite ist die Markierungskinetik für die Kontrollen und für die Chloroplasten aus Blättern von 7 Tage verdunkelten Pflanzen in den Abb. 8 und 9 dargestellt. Da innerhalb der Anfangsphase auf Grund der geringen Gesamtmarkierung keine sichere Bestimmung durchzuführen war, ist der Markierungsverlauf für diesen Zeitraum nur hypothetisch unter der Voraussetzung, daß 3-PGS als erstes Markierungsprodukt auftritt, eingetragen.

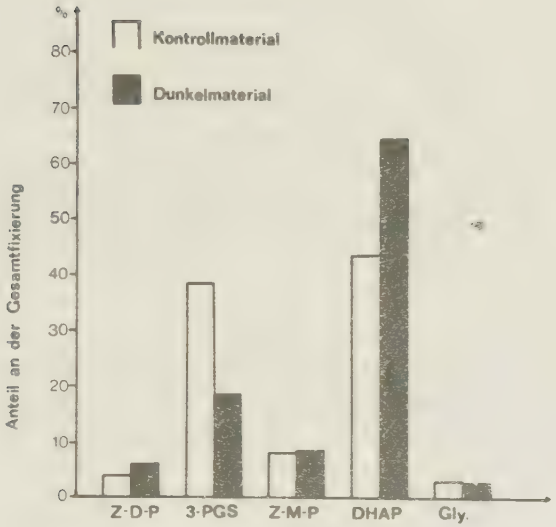

Abb. 7

Markierungsmuster isolierter Chloroplasten aus Kontroll- und verdunkeltem Material (9 Tage) mit Vorbelichtung nach 6,5 Minuten CO_2-Fixierung

Es bedeuten: Z-D-P=Zuckerdiphosphate(RuDP.FDP u. a.), Z-M-P=Zuckermonophosphate (Hexose-, Pentosemonophosphate u. a.), Gly = Glykolat pH-Wert im Reaktionsmedium = 7,6

Bereits nach 2 Minuten Fixierung besitzt DHAP eine stärkere Markierung als 3-PGS. Im weiteren Verlauf steigt 3-PGS wieder an und war in fast allen Versuchen

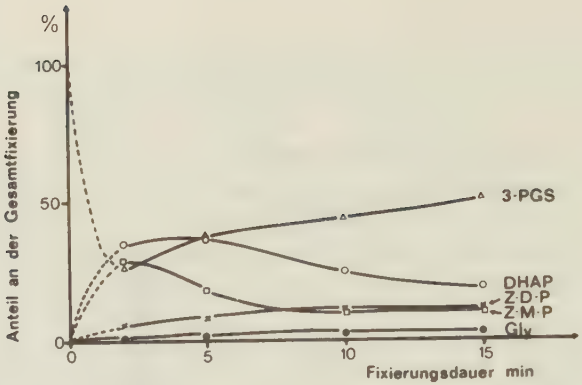

Abb. 8

Kinetik der Metabolitmarkierung bei isolierten Chloroplasten aus Kontrollmaterial
Bezeichnungen und pH wie bei Abb. 7

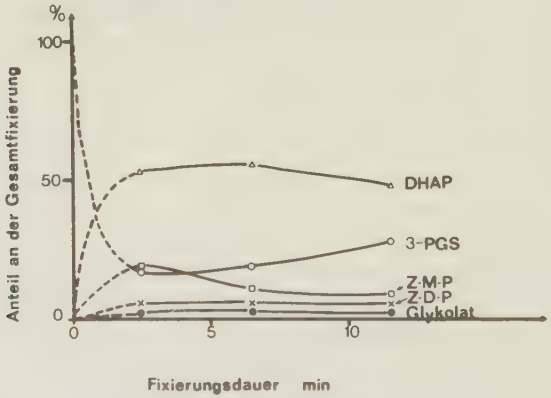

Abb. 9

Kinetik der Metabolitmarkierung bei isolierten Chloroplasten aus verdunkeltem Material nach Vorbelichtung
Verdunklungsdauer = 7 Tage
Bezeichnungen und pH wie Abb. 7

nach 15 Minuten unter den markierten Substanzen die dominierende Komponente, während DHAP und vor allem die Zuckermonophosphate wieder absinken. Obwohl für die Chloroplasten aus Kontrollmaterial diese Tendenzen stets gefunden wurden, ergaben sich gewisse Unterschiede im Verhältnis von 3-PGS zu DHAP. So waren nach 6 bis 7 Minuten Fixierungszeit 3-PGS oder DHAP stärker markiert. Diese Variabilität konnte nicht in eine eindeutige Beziehung zur Fixierungsrate der betreffenden Präparation gebracht werden. Eine Veränderung der Chlorophyllmenge im Ansatz von 50 bis 150 µg/ml führte gleichfalls zu keiner klaren Änderung des Markierungsverhältnisses zwischen 3-PGS und DHAP. Bestätigt werden diese Erfahrungen durch Angaben in der Literatur, wo sich zum Teil sehr viel drastischer Unterschiede im Markierungsverhältnis einzelner Komponenten finden (Winkenbach et al., 1972; Bassham et al., 1968; Bassham et al., 1970; Coombs und Baldry, 1971).

Trotz dieser Schwankungen wird aber die völlig andere Einbaukinetik bei Chloroplasten aus verdunkeltem Material deutlich, die sich stets in einem Überwiegen der Markierung von DHAP im gesamten untersuchten Zeitraum zeigt (Abb. 9). Die relativ geringe Markierung von 3-PGS steigt erst nach 11 bis 12 Minuten leicht an. Grundsätzlich besagt dieser Befund, daß durch die Verdunklung die Reduktion von 3-PGS zu den Triosephosphaten nicht entscheidend beeinflußt wird. Auf mögliche Hemmstellen oder Änderungen des Aktivitätszustandes wird in der Diskussion ausführlicher eingegangen. Wie weiter unter II.1.8. gezeigt wird, spielt für die Verteilung der Markierung die Vorbelichtung des Blattmaterials der verdunkelten Pflanzen eine wichtige Rolle.

III.1.5. Der Einfluß der Verdunklungsdauer der Pflanzen auf die Aktivitätsverteilung.

Wie die Abb. 10 zeigt, ist die höhere Markierung von DHAP von der Verdunklungsdauer der Pflanzen abhängig. Bei einer Assimilationsdauer von 7 Minuten setzt die Tendenz einer dominierenden Fixierung im DHAP mit einem Abfall in 3-PGS nach 2 Tagen ein und verstärkt sich bis zum 9. Verdunklungstag kontinuierlich, wo 65 % der Aktivität im Triosephosphat und nur 17 % in 3-PGS vorliegen.

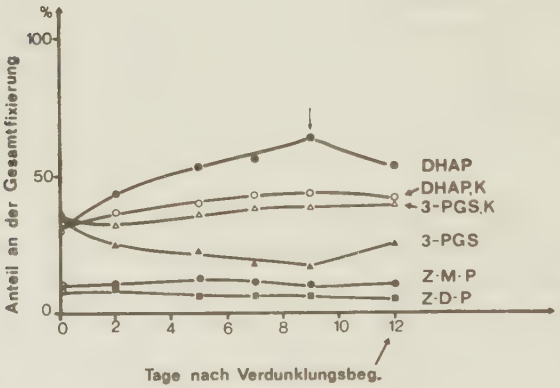

Abb. 10

Abhängigkeit der Markierungsverteilung von der Verdunklungsdauer bei isolierten Chloroplasten aus vorbelichtetem Material. Der Pfeil am 9. Verdunklungstag deutet den Beginn der Regeneration an. Zum Vergleich sind die Markierungen von 3-PGS und DHAP für das Kontrollmaterial mit aufgeführt (DHAP, K; 3-PGS, K). Bezeichnungen wie bei Abb. 7.

Die Hexosephosphate bleiben im Verlauf der Verdunklung nahezu unverändert. Zum Vergleich sind die Markierungsanteile von 3-PGS und DHAP der jeweiligen Kontrollchloroplasten mit aufgeführt. Eine 3tägige Regeneration unter normalen Kulturbedingungen bewirkt noch keine völlige Aufhebung der erhöhten DHAP-Markierung.

III.1.6. Die Regeneration und der Einsatz von Inhibitoren der Proteinsynthese.

Wie aus den Abb. 6 und 10 hervorgeht, kommt es nach Überführung der verdunkelten Pflanzen in normale Kulturbedingungen hinsichtlich der Gesamtfixierung nach 3 Tagen zu einer vollständigen Regeneration. Das Verteilungsmuster nähert sich dem Muster der Chloroplasten aus Kontrollmaterial an.

Wie in einem späteren Kapitel (III.3.2.) gezeigt wird, sinkt die Aktivität der RuDP-Carboxylase während einer entsprechenden Verdunklung um etwa 30 % ab, so daß mit einem gewissen Proteinabbau gerechnet werden muß. Da es mit der Belichtung bei der Regeneration zu einer Aktivitätszunahme des Enzyms kommt, ergibt sich die Frage, ob die Reaktivierung auf eine Proteinbiosynthese oder auf andere regulative Faktoren zurückgeführt werden kann. Zur Hemmung der Proteinsynthese in Chloroplasten wurden bei verschiedenen Untersuchungen häufig D-threo-Chloramphenicol und in neuerer Zeit vermehrt Lincomycin eingesetzt (Ellis und Hartley, 1971; Margulies, 1964; Parthier, 1965). Da speziell für Chloramphenicol starke Nebenwirkungen auf andere Stoffwechselvorgänge beschrieben wurden, wurde zunächst der Einfluß der verwendeten Hemmstoffe auf die CO_2-Fixierung isolierter Chloroplasten untersucht.

Für Chloramphenicol ergab sich eine starke Hemmung des CO_2-Einbaus. Aus Abb. 11 wird eine 50 %ige Hemmung bei einer Konzentration von etwa 0,15 mM deutlich. Chloroplasten aus Material, das mit Chloramphenicol behandelt wurde, könnten durch die Präparation mit hemmenden Mengen von Chloramphenicol kontaminiert sein und artifizielle Fixierungsraten zeigen. Für Regenerationsversuche wurde daher Chloramphenicol nicht mehr benutzt.

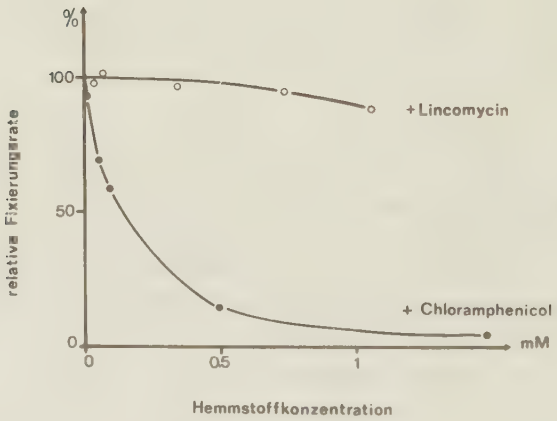

Abb. 11

Einfluß von Lincomycin und D-threo-Chloramphenicol auf die CO_2-Fixierung isolierter Chloroplasten aus Kontrollmaterial.
Die angegebenen Fixierungsraten beziehen sich auf die Fixierungsraten ohne Zusatz von Hemmstoffen (= 100 %).

Ein entsprechender Versuch wurde für Lincomycin ebenfalls durchgeführt. Wie Abb. 11 zeigt, führen erst Lincomycinkonzentrationen von 1 mM zu einer sehr schwachen Hemmung der CO_2-Fixierung isolierter Chloroplasten. Für die folgenden Versuche wurde aus diesem Grunde Lincomycin eingesetzt.

Um eine gleichmäßige und ausreichende Aufnahme des Hemmstoffs durch die Blätter zu gewährleisten, wurden abgeschnittene Blätter von verdunkeltem Spinat in Leitungswasser mit und ohne Lincomycin überführt. Durch Abdecken mit einer Glasplatte wurde sichergestellt, daß die Blätter vollständig von Wasser umgeben waren. Zur Regeneration wurde das Material in den Kontrollkulturraum gestellt. Die Lincomycinkonzentration betrug 1,13 mM. Vorversuche mit abgeschnittenen Kontrollblättern, die unter gleichen Umständen ohne Lincomycinzusatz 3 Tage im Kulturraum aufbewahrt wurden, hatten gezeigt, daß Chloroplastenpräparationen aus diesem Material nur wenig kleinere Raten (80 %) zeigten als Präparationen aus nicht abgeschnittenen Kontrollblättern. Die Fixierungskapazität der Chloroplasten bleibt bei der geschilderten Behandlung weitgehend erhalten.

Die Tabelle 1 faßt die Fixierungsraten der verschiedenen Chloroplastenpräparationen nach Vorbelichtung zusammen.

Tabelle 1

Die Wirkung von Lincomycin auf die CO_2-Fixierung isolierter Chloroplasten während der Regeneration von verdunkeltem Spinat.

Material	Fixierungsrate ($\frac{\mu mol\ CO_2/mg\ Chl.}{h}$)
Kontrolle, ganze Pflanzen	35,0
Dunkelmaterial, ganze Pfl.-9 d	8,6
Regener.3 d, Blätter in Wasser	29,4
Regener.3 d, Blätter, Wasser, Lincom.	14,4

Die Angaben der Tabelle 1 zeigen eine durch Lincomycin erniedrigte Regeneration. Eine chloroplastenspezifische Proteinsynthese scheint bei der Regeneration beteiligt zu sein. Ein Einfluß des Lincomycins auf bestimmte Enzymsysteme der Chloroplasten während der Regeneration konnte nicht gefunden werden. Wie schon die Abb. 9 zeigt, bleibt das Fixierungsmuster trotz einer hohen CO_2-Fixierungsrate beim regenerierenden Material vom Muster des Kontrollmaterials verschieden. Ein Lincomycin-Zusatz ändert diese Verhältnisse bei den Fixierungsmustern nicht. Während der Regeneration scheint nach diesen Ergebnissen keine der enzymatischen Aktivitäten des reduktiven Pentosephosphatzyklus besonders anzusteigen.

III.1.7. Die Abhängigkeit der Markierungsverteilung vom pH-Wert des Reaktionsmediums.

Bei den bisher vorgelegten Ergebnissen fällt auf, daß besonders beim verdunkelten Material neben einer eingeschränkten Fixierungsrate eine hohe Markierung des DHAP auftritt. Der Anstieg dieses Metaboliten kann mehrere Gründe haben. Einmal muß, insbesondere für Triosen, ein verstärkter Austritt in das Medium berücksichtigt werden (Bassham et al., 1968, Heber et al. 1967), wodurch es im Stroma des Chloroplasten zu einer Konzentrationsabnahme und damit zu einem verminderten Durchsatz kommen kann. Zum anderen ließe sich eine partielle Hemmung einer Folgereaktion des DHAP-Umsatzes diskutieren.

Mit den folgenden Experimenten sollte durch Variation der Reaktionsbedingungen versucht werden, Änderungen im Markierungsmuster zu erhalten, um im weiteren Hinweise für die Ursache des andersartigen Umsatzes zu

finden. Als Variable wurde der pH-Wert des Mediums gewählt, der, wie in Kapitel III.1.2. gezeigt wurde, unterschiedliche Maxima in der Gesamtfixierung für das Kontrollmaterial und für Chloroplasten aus verdunkeltem Material aufweist.

Die Veränderung der Verteilung von fixiertem $^{14}CO_2$ in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums ist in Abb. 12 a, 12 b und 12 c dargestellt; die Fixierungszeit betrug bei diesen Experimenten 7 Minuten. Auffallend ist zunächst, daß der Anteil an 3-PGS in dem pH-Bereich am größten ist, wo die Kontrollen das Optimum der Fixierung besitzen. Für alle anderen Intermediate ergeben sich dagegen mit geringen Abweichungen bestimmte Tendenzen der Zu- und Abnahme über den erfaßten pH-Bereich von 6,7 bis 8,9. Bei der nur für 3-PGS gemessenen Optimumskurve muß allerdings berücksichtigt werden, daß neben einer pH-bedingten Beeinflussung bestimmter Enzymaktivitäten (RuDP-Carboxylase ?) eine Verringerung der Substratkonzentration (CO_2) bei hohen pH-Werten auftreten kann (siehe auch Kapitel III.1.2.), die den Markierungsanteil von 3-PGS beeinflussen könnte. Die verstärkte Synthese von Glykolat, die vor allem bei pH-Werten über 8 auftritt, stützt eine derartige Annahme, zumal die Bildung von Glykolat durch CO_2-Mangel gefördert wird. Unter Berücksichtigung der apparenten CO_2-Konzentration zeigten jedoch Versuche von Dodd und Bidwell (1971) mit Chloroplasten aus Acetabularia, daß die hohe Markierung von Glykolat bei alkalischen pH-Werten nicht allein auf einen Mangel an verfügbarem CO_2 zurückgeführt werden kann. Als Erklärung bietet sich eine verminderte RuDP-Carboxylase-Aktivität und eine erhöhte RuDP-Oxygenase-Aktivität im Bereich hoher pH-Werte an (Andrews et al., 1973). 3-PGS und

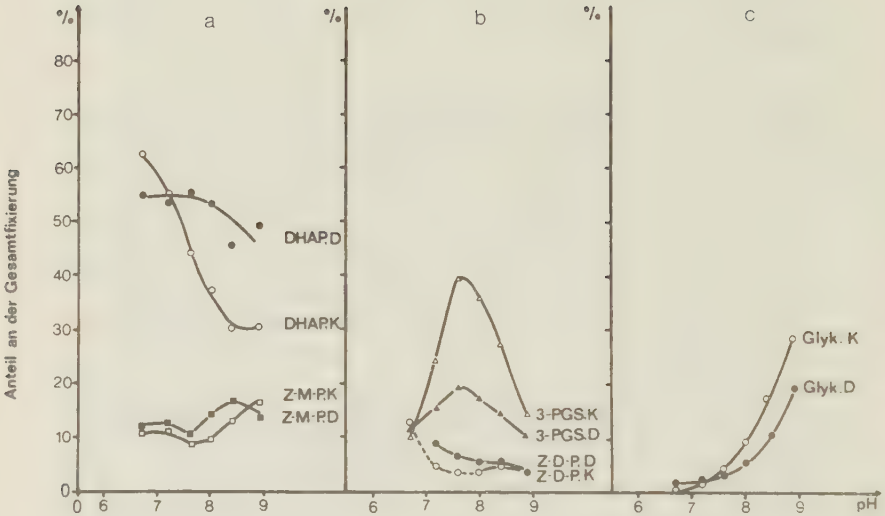

Abb. 12

Einfluß des pH-Wertes im Reaktionsmedium auf die Markierungsverteilung bei der $^{14}CO_2$-Fixierung isolierter Chloroplasten aus Kontroll- und verdunkeltem Material (7 Tage) nach Vorbelichtung. Die Substanzbezeichnungen mit K weisen auf Chloroplasten des Kontrollmaterials, mit D auf Chloroplasten von verdunkeltem Material hin. Die Abbildung gibt für die aufgeführten Metabolite den jeweiligen prozentualen Anteil an der Gesamtfixierung an. Bezeichnungen wie Abb. 7.

Glykolat werden in konkurrierenden Reaktionen gebildet, bei hohen pH-Werten dominiert Glykolat. Als weitere drastische Änderung fällt das Absinken in der Markierung von DHAP mit zunehmendem pH-Wert in den Kontrollen auf. Bei pH 6,7 finden sich über 60 % des gesamten fixierten $^{14}CO_2$ im DHAP, während es bei pH-Werten über 8 nur noch 30 % sind. Im Gegensatz dazu ist die Verringerung bei den Chloroplasten aus verdunkeltem Material viel weniger stark, so daß DHAP stets das Hauptmarkierungsprodukt ist.

Bei den Zuckermonophosphaten ist sowohl bei den Chloroplasten aus verdunkeltem Material als auch beim Kontrollmaterial ein Anstieg bei höheren pH-Werten zu erkennen, eine umgekehrte Tendenz findet sich bei den Zuckerdiphosphaten. Die Tabelle 2 zeigt für die verschiedenen pH-Stufen das Verhältnis von Zuckermonophosphaten, in erster Linie durch die Hexosemonophosphate vertreten, zu den Zuckerdiphosphaten;hier ist FDP stark an der Markierung beteiligt. Unabhängig vom Material ergibt sich ein etwa gleichartiger Anstieg des Verhältnisses mit wachsendem pH-Wert.

Tabelle 2

Verhältnis der Zuckermonophosphate zu den Zuckerdiphosphaten in Abhängigkeit vom pH-Wert des Reaktionsmediums. Versuchsbedingungen: siehe Text.

pH-Stufen	6.7	7.2	7.6	8,0	8,4	8,9
Z-M-P/Z-D-P, Kontrolle	0,85	2,2	2,4	2,8	2,6	4,7
Z-M-P/Z-D-P, verd. Mat.	-	1,4	1,6	2,6	3,0	4,0

Die dargestellten Befunde werden in der Diskussion eingehend erörtert.

III.1.8. Die CO_2-Fixierung und die Markierungsverteilung bei Chloroplasten ohne Vorbelichtung der Blätter.Das Problem der Lichtaktivierung

Wie in Kap. III.1.1. gezeigt wurde,besitzen die isolierten Chloroplasten hinsichtlich der CO_2-Fixierung eine lag-Phase, die durch eine Vorbelichtung der Blätter unmittelbar vor der Isolation der Chloroplasten eliminiert werden kann.Daneben zeigt sich besonders bei Chloroplasten aus verdunkeltem Material ein entscheidender Einfluß der Vorbelichtung auf die Fixierungskapazität.Eine Belichtung der isolierten Chloroplasten aktiviert zwar die CO_2-Fixierung ebenfalls,das Erreichen einer konstanten Maximalrate nach vorübergehender lag-Phase belegt dies;trotzdem werden isolierte Chloroplasten bei Belichtung innerhalb der hier verwendeten Versuchszeit nicht in den gleichen physiologischen Zustand versetzt,den eine Vorbelichtung des intakten Blattgewebes unmittelbar vor der Isolation bewirkt.Das wird klar deutlich,wenn man die Abb. 13 mit der Abb. 6 von S. 25 vergleicht.In Abb.13 sind die Fixierungsraten isolierter Chloroplasten aus nicht vorbelichtetem Material während einer längeren Verdunklungszeit aufgezeichnet.

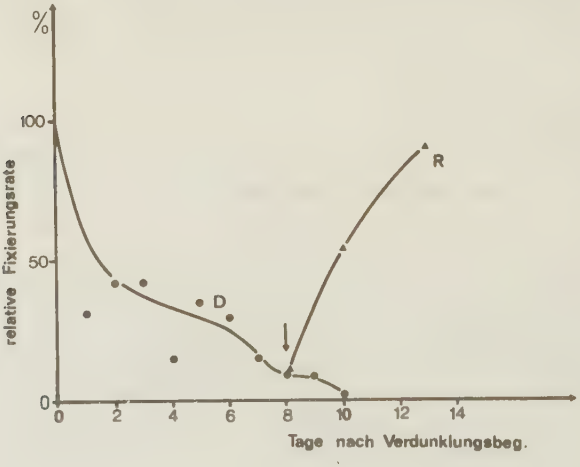

Abb. 13

Einfluß der Verdunklungsdauer auf die CO_2-Fixierung isolierter Chloroplasten
Die Chloroplasten wurden aus nicht vorbelichtetem Material isoliert.Vergleiche Abb.6,S.25

Bei Kontrollraten von 23 bis 28,5 /u mol CO_2/mg Chl. x h und einem Mittelwert von 26/u mol CO_2/mg Chl. x h zeigt sich schon nach 1 bis 2 Tagen Verdunklung ein starker Abfall der Fixierungsrate auf etwa 40 % der Kontrollrate.Nach 10 Verdunklungstagen beträgt die Fixierungsrate nur noch 2 % der Kontrolle.Auch hier setzt nach dem Überführen der verdunkelten Pflanzen in normale Kulturbedingungen eine schnelle Regeneration ein.

Um Anhaltspunkte über die Ursachen dieser verminderten Fixierungskapazität beim nicht vorbelichteten Material zu erhalten, wurden auch hier die Fixierungsmuster untersucht.Auf Grund der geringfügigen Unterschiede bei der Belichtung wurden beim Kontrollmaterial keine signifikanten Unterschiede zwischen Chloroplastenpräparationen aus vorbelichteten und nicht vorbelichteten Blättern gefunden.Beim verdunkelten Material ergaben sich ähnlich wie bei den Fixierungsraten deutliche Unterschiede.Lag bei 7 Tage verdunkelten Pflanzen nach einer Fixierungszeit von 7 Minuten das Verhältnis DHAP/3-PGS bei 2,5-3,0,so sank es bei Chloroplasten aus nicht vorbelichteten Blättern auf 1,3 bis 1,7 . Der verringerte Markierungsanteil des DHAP wurde von einer Abnahme der Zuckerdiphosphatmarkierung begleitet,wie die Tabelle 3 zeigt.

Tabelle 3

Veränderung der Markierung der Zuckerdiphosphate bei Chloroplasten aus nicht vorbelichteten Blättern während einer Verdunklungsreihe.Fixierungsdauer=15 Minuten.
Es wird das Verhältnis der Markierungsanteile der Zuckerdiphosphate von verdunkeltem- und Kontrollmaterial angegeben.

Verdunklungszeit/d	1	2	3	4	5	6	7	8
Z-D-P, D/K	1,1	0,65	0,38	0,31	0,23	0,46	0,54	0,62

Die zum vorbelichteten Material relativ geringe DHAP-Markierung und die erniedrigte Markierung der

Zuckerdiphosphate bei nahezu unveränderten Zuckermonophosphaten läßt eine partielle Hemmung im Bereich der 3-PGS-Reduktion vermuten. Ob beim verdunkelten Material hierfür eine mangelhafte Aktivierung der NADP-abhängigen GAPDH verantwortlich ist, muß offen bleiben (Ziegler et al., 1968). Eine mangelhafte Aktivierung weiterer lichtaktivierbarer Enzyme des reduktiven Pentosephosphatzyklus, wie RuDP-Carboxylase, Fruktose-1,6-Diphosphatase (E.C.3.1.3.11) und Ribulokinase (E.C.2.7.1.19) kann nicht abgeleitet werden .

III.2. Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf die CO_2-Assimilation in intakten Blattgeweben.

Wie in der Diskussion noch ausführlicher erörtert, geben die Experimente mit den isolierten Chloroplasten keinen eindeutigen Hinweis auf eine bevorzugte Inaktivierung bestimmter Enzyme des reduktiven Pentosephosphatzyklus. Die Ergebnisse deuteten eher auf eine erhöhte Freisetzung von DHAP in das Reaktionsmedium hin. Es mußte zunächst offen bleiben, ob dieser erhöhte Transport von DHAP gegenüber 3-PGS nach außen durch eine Veränderung von Translokase-Aktivitäten (Heldt und Rapley, 1970) verursacht wird, der auch in vivo eine Bedeutung hat, oder ob diese Permeabilitätsänderung nur der Ausdruck einer durch die Präparation verstärkt geschädigten Chloroplastenhülle ist.

Es wurden daher die Verteilungsmuster von intakten Blattstücken bei verschiedenen Bedingungen untersucht und mit den Ergebnissen verglichen, die an isolierten Chloroplasten erarbeitet wurden. Die an Blattgewebe gewonnenen Ergebnisse gestatten unter Einbeziehung der Kenntnisse über die biochemische Topographie der Zelle fernerhin, den Einfluß der Verdunklung in Stoffwechselabschnitten zu erfassen, die in verschiedenen Zellräumen lokalisiert sind.

III.2.1. Das Markierungsmuster intakter Blattstücke im Vergleich zum Fixierungsmuster isolierter Chloroplasten.

Die Abb.14 und 15 geben eine Vorstellung darüber, in welchem Ausmaß sich die Markierungsmuster von isolierten Chloroplasten von denen intakter Blattstücke unterscheiden. Die Abb.14 zeigt für eine Chloroplastenpräparation aus Kontrollmaterial das Radioautogramm nach einer Fixierungszeit von 7 Minuten. Wie schon im vorangegangenen Abschnitt ausführlich erläutert, sind die Hauptprodukte der Fixierung 3-PGS und DHAP. Im geschilderten Fall liegen hier die Anteile für 3-PGS bei 44 % und für DHAP bei 36 %. Mit weitem Abstand folgen die Glukosemonophosphate, die Zuckerdiphosphate, Glykolat, Fruktose-6-Phosphat und die Pentosephosphate. Sehr schwache Markierungen zeigen Sedoheptulosephosphat, Zitrat/Glycerat, Malat, PEP und Glycin/Serin.

Ein stark abweichendes Muster besitzen Blattstücke des Kontrollmaterials nach der CO_2-Fixierung bei 0,05 % CO_2 (Abb.15). Hier sind nach einer Fixierungszeit von 15 Sekunden bei 15 Minuten Vorbelichtung die markierten Metabolite analysiert worden. Neben den Zuckerphosphaten sind eine Reihe von Verbindungen stärker markiert, die bei Chloroplastenfixierungen keine oder nur sehr geringe Radioaktivität besitzen. Besonders fallen in diesem Zusammenhang Sucrose, Glycin/Serin, Malat, Aspartat, Alanin, PEP, Pyruvat und UDP-Glukose auf. Hinsichtlich der Zuckerphosphate bzw. der 3-PGS ist zu bemerken, daß im Gegensatz zu den Chloroplasten DHAP nur schwach markiert ist. Der Markierungsanteil von DHAP lag zwischen 1 und 2 %. Auch bei Experimenten, bei denen $^{14}CO_2$ nur etwa 3 Sekunden angeboten wurde, betrug die

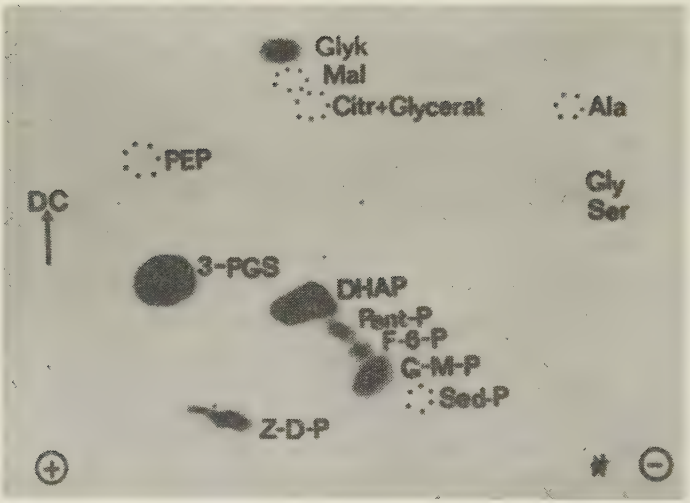

Abb. 14

Markierungsmuster isolierter Chloroplasten aus Kontrollmaterial nach einer Fixierungszeit von 7 Minuten
Aufgetragene Radioaktivität: 4350 dpm, davon 4000 dpm wiedergefunden. Es bedeuten: 3-PGS = 3-Phosphoglycerinsäure, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, PEP = Phosphoenolpyruvat, G-M-P = Glukosemonophosphate, F-6-P = Fruktose-6-Phosphat, Pent-P = Pentosephosphate, Ala = Alanin, Sed-P = Sedoheptulosephosphat, Z-D-P = Zuckerdiphosphate, Mal = Malat, Gly/Ser = Glycin/Serin, Citr = Citrat, Glyk = Glykolat. Der Verlauf des elektrischen Feldes während der Elektrophorese ist durch + und- angegeben; die Laufrichtung der Dünnschichtchromatographie durch DC und einen Pfeil, der Startfleck ist durch x gekennzeichnet.

DHAP-Markierung bei einer 3-PGS-Markierung von über 80 % nur ca. 3 %. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Jensen und Bassham (1966) und Grant et al. (1972) beschrieben.

Diese Unterschiede zwischen den Chloroplasten und den Blattstücken sind durch eine Reihe von Gründen bedingt. Bestimmte Metabolite, wie 3-PGS, DHAP und Glykolat können den Chloroplasten leicht verlassen und werden in anderen Zellräumen umgesetzt (Walker und Crofts, 1970; Tolbert, 1971). Weiterhin können die verschiedenen Fixierungsmuster durch artifizielle Veränderungen der Chloroplasten während der Präparation verursacht werden. Dabei gehen den Chloroplasten bestimmte biochemische Eigenschaften verloren, die ihnen in vivo zugesprochen werden. Als Beispiel sei hier die Sucrose-Synthese erwähnt. Isolierte Chloroplasten höherer Pflanzen mit der Fähigkeit zur Sucrose-Synthese wurden bisher nur ausnahmsweise beschrieben (Everson et al., 1967), obwohl wesentliche Enzyme des Syntheseweges im Chloroplasten lokalisiert sind (Hatch und Slack, 1970); können die Chloroplasten wie bei Acetabularia sehr schonend isoliert werden, dann läßt sich eine Sucrose-Synthese der Chloroplasten gut nachweisen (Dodd und Bidwell, 1971).

Die vergleichsweise hohe Markierung von Malat und Aspartat bei den Blattstücken läßt sich am besten über eine weitere Carboxylierungsreaktion erklären. Bandurski und Greiner wiesen bereits 1953 beim Spinat die PEP-Carboxylase nach. Dieses Enzym katalysiert die irreversible Carboxylierung von PEP mit HCO_3^- (Cooper, 1971) zu Oxalacetat. Durch eine Transaminase oder über MDH kann Oxalacetat in Aspartat und Malat umgewandelt

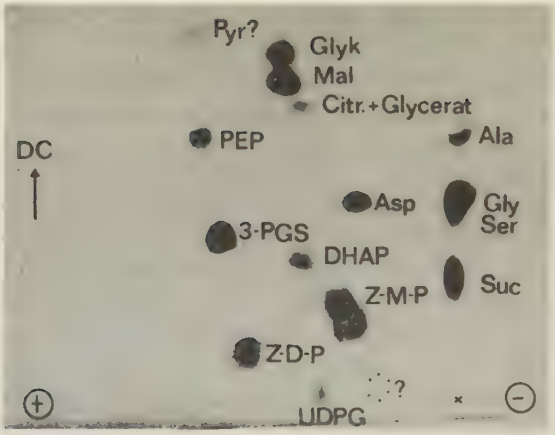

Abb. 15

Markierungsmuster von Blattstücken des Kontrollmaterials
Aufgetragene Radioaktivität: 10600 dpm, davon 9700 dpm wiedergefunden. Versuchsbedingungen siehe Text, Substanzbezeichnungen siehe Legende zu Abb. 14. Es bedeuten außerdem Pyr = Pyruvat, Suc = Sucrose, UDPG = Uridindiphosphat-glukose, Asp = Aspartat, Z-M-P = Zuckermonophosphate, ? = unbekannte Substanz.

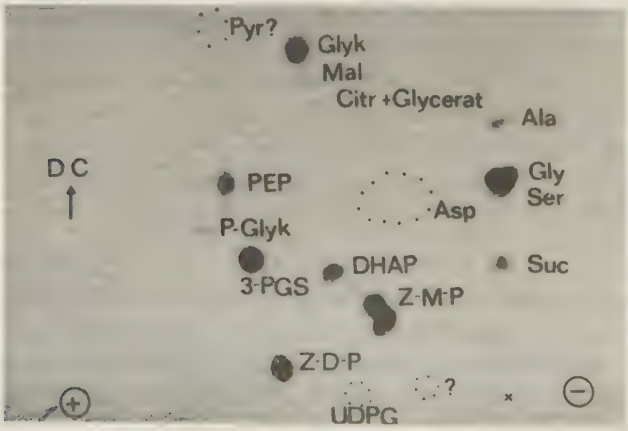

Abb. 16

Markierungsmuster von Blattstücken von 7 Tage verdunkelten Pflanzen
Aufgetragene Radioaktivität: 4250 dpm, davon 3700 dpm wiedergefunden. Versuchsbedingungen siehe Text, Substanzbezeichnungen siehe Legende zu Abb. 14, 15 . Es bedeutet außerdem: P-Glyk = Glykolatphosphat

werden. Für C_3-Pflanzen sprechen eine Reihe von Hinweisen für eine Lokalisation des Enzyms im Zytoplasma (Ting und Osmond, 1973 b).

III.2.2. Das Markierungsmuster von Blattstücken aus verdunkelten Pflanzen.

Werden unter den in Kapitel III.2.1. angegebenen Bedingungen Blattstücke von 7 Tage verdunkelten Pflanzen zu den Markierungsversuchen eingesetzt, dann zeigt sich das in Abb.16 wiedergegebene Muster. Es ähnelt in wesentlichen Zügen dem Muster des Kontrollmaterials, allerdings fallen speziell bei Malat und Aspartat die sehr geringen Markierungen beim verdunkelten Material auf. Weitere Unterschiede können den Radioautogrammen nicht sicher entnommen werden. Da die Unterschiede bei der Markierung der C_4-Säuren bereits in Vorversuchen bei 5 und 10 Minuten dauernden Fixierungszeiten auftauchten, hier aber auf Grund der langen Versuchsdauer keine klare Entscheidung über die Herkunft der Markierung getroffen werden konnte, wurde eine Kinetik der Markierungsverteilung im Bereich von 5 bis 45 Sekunden aufgenommen.

III.2.3. Kinetik der Markierungsverteilung bei Blattstücken des Kontroll- und des verdunkelten Materials.

Die Markierungskinetiken der wichtigsten Substanzen bzw. Substanzgruppen nach der CO_2-Fixierung von Blattstücken in 0,05 % CO_2 sind in Abb.17a,b,c,d aufgeführt. Die Dauer der Verdunklung betrug 7 Tage. Mit steigender Fixierungsdauer fallen die Zuckerphosphate und 3-PGS ab. Glycin/Serin und etwas verzögert Sucrose nehmen zu (Abb.17a,b). Die Markierungskinetiken zeigen den schon

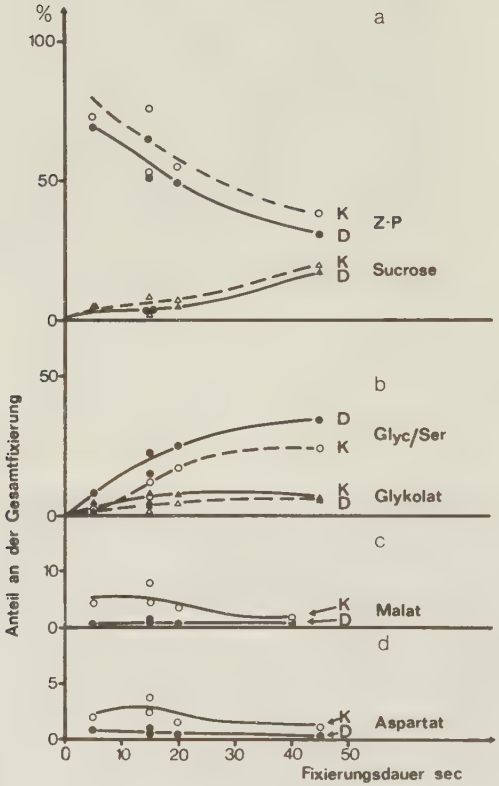

Abb. 17

Kinetik der Metabolitmarkierung bei Blattstücken von Kontroll- und verdunkeltem Material
Versuchsbedingungen siehe Text. Es bedeuten:K = Kontrollmaterial, D = verdunkeltes Material, Z-P = Zuckerphosphate und 3-PGS.

öfters beschriebenen Verlauf, wie er z. B. von Osmond et al. (1969) für Atriplex hastata nachgewiesen wurde. Zwischen dem Kontrollmaterial und den verdunkelten Pflanzen zeigen sich bei den Phosphatestern und der Sucrose keine deutlichen Unterschiede. Da aus methodischen Gründen nur relativ geringe Mengen Blattmaterial von 6 bis 9 Blättern verschiedener Pflanzen verwendet wurden, kam es zu gewissen Schwankungen, die durch die Inhomogenität des Blattmaterials bedingt waren.

Beim Glycin/Serin zeigten die Markierungen bei den verdunkelten Pflanzen stets beträchtlich höhere Markierungen. Die Glykolsäure als Vorläufer der Glycin/Serin-Synthese besaß bei kurzen Fixierungszeiten höhere Markierungsanteile.

Wie schon in den Autoradiogrammen deutlich, ist die Radioaktivität bei Malat und Aspartat (Abb. 17 c,d) beim verdunkelten Material stets geringer als beim Kontrollmaterial. Beim Kontrollmaterial zeigen sich häufig Markierungen von 4 bis 5 %, vereinzelt sogar 8 %, die verdunkelten Pflanzen besitzen nie mehr als 1 %.

Die eingebaute Radioaktivität bei weiteren hier nicht aufgeführten Metaboliten wie PEP, Pyruvat, Alanin und Citrat/Glycerat liegt jeweils im Bereich von 1 bis 4,5 % der Gesamtmarkierung und belegt keine klaren Unterschiede zwischen Kontrollmaterial und verdunkelten Pflanzen. Auch die Markierungsanteile bei DHAP liegen unabhängig vom Material bei etwa 2 - 3 %.

Unter den aufgeführten Versuchsbedingungen wurden relativ niedrige CO_2-Fixierungsraten von 30 bis 55 /u mol CO_2/h x g Frischgewicht für die Kontrollen gemessen.

Beim verdunkelten Spinat (7 Tage) lagen die Raten zwischen 21 und 29 /u mol CO_2/h x g Frischgewicht und betrugen im Mittel etwa 55 bis 60 % der Kontrolle. Beim Vergleich dieser Raten mit den Raten isolierter Chloroplasten muß berücksichtigt werden, daß die genannte CO_2-Konzentration bei den Blattstücken nicht sättigend ist, eine hohe CO_2-Tension erhöht die Raten der Fixierung auf 90 /u mol CO_2/h xgFrischgewicht. Bei Chlorophyllgehalten von 1,2 bis 1,4 mg Chl./g F.-G. sind die Einbauraten in etwa mit Raten anderer Autoren vergleichbar (Grant et al. 1972). Bassham et al. (1968) gibt bei ganzen Spinatblättern allerdings erheblich höhere Fixierungsraten an.

III.2.4. Der Einfluß der CO_2-Konzentration auf die Markierungsverteilung

Hinsichtlich der, insbesondere für die C_4-Körper festgestellten geringeren Markierung in den Blättern verdunkelter Pflanzen, muß neben einer verminderten Enzymaktivität vor allem an eine eingeschränkte CO_2-Versorgung als Ursache für das andersartige Markierungsmuster gedacht werden. Bei den in Kapitel III.2.3. geschilderten Experimenten war nicht auszuschließen, daß durch die Verdunklung in den Schließzellen veränderte Eigenschaften induziert wurden (Zelitch, 1969). Es bestand daher die Möglichkeit, daß ein unterschiedlicher Öffnungszustand der Spaltöffungen je nach Material verschiedene CO_2-Konzentrationen im Blattgewebe verursachte. Coombs et al. (1973 b) konnten bei der C_4-Pflanze Pennisetum mit zunehmender CO_2-Konzentration eine geförderte Markierung in den Zuckerphosphaten mit einer simultanen Abnahme in den C_4-Körpern feststellen. Niedrige CO_2-Tensionen führen

bei höheren Sauerstoffkonzentrationen zu einer verstärkten Bildung von Intermediaten der Lichtatmung (Jackson und Volk, 1970).

Um einen möglichen Einfluß der Spaltöffnungen auf das Muster abschätzen zu können, wurde in den folgenden Fixierungsexperimenten die Abhängigkeit des Markierungsmusters von der CO_2-Konzentration untersucht. Die Abb. 18 zeigt die Markierungsverteilung nach 1 Minute CO_2-Fixierung bei CO_2-Konzentrationen von 1 und 0,015 %. Die Verdunklungszeit betrug 8 Tage; die Angaben beziehen sich auf den prozentualen Anteil der Markierung an der Gesamtfixierung. Bei hoher CO_2-Konzentration ist sowohl beim verdunkelten Material als auch bei der Kontrolle die Sucrose das Hauptfixierungsprodukt. Außerdem ist die Alanin-Markierung bei hohen CO_2-Tensionen gefördert. Glycin/Serin und Glykolsäure als Intermediate der Lichtatmung zeigen dagegen im Vergleich zu niedrigen CO_2-Partialdrücken einen deutlichen Abfall und spielen nur eine geringe Rolle. Wesentliche Unterschiede zwischen dem Kontrollmaterial und den verdunkelten Pflanzen zeigen sich erneut bei Malat und Aspartat. Hier liegen die Markierungen bei den verdunkelten Pflanzen beträchtlich niedriger als bei den Kontrollen. Die Tendenz einer höheren Markierung von Glycin/Serin beim verdunkelten Material zeigt sich wiederum, bei sehr niedrigen CO_2-Konzentrationen sind die Markierungsunterschiede jedoch nicht stark ausgeprägt. Auffällig ist nach 1 Minute Fixierungszeit hier der Anstau von UDPG und der unbekannten Substanz. Im Zusammenhang mit der erhöhten Markierung der übrigen Phosphatester und der verringerten Sucrose-Markierung scheint eine gewisse Hemmung der Sucrose-Synthese bei den verdunkelten Pflanzen zu bestehen.

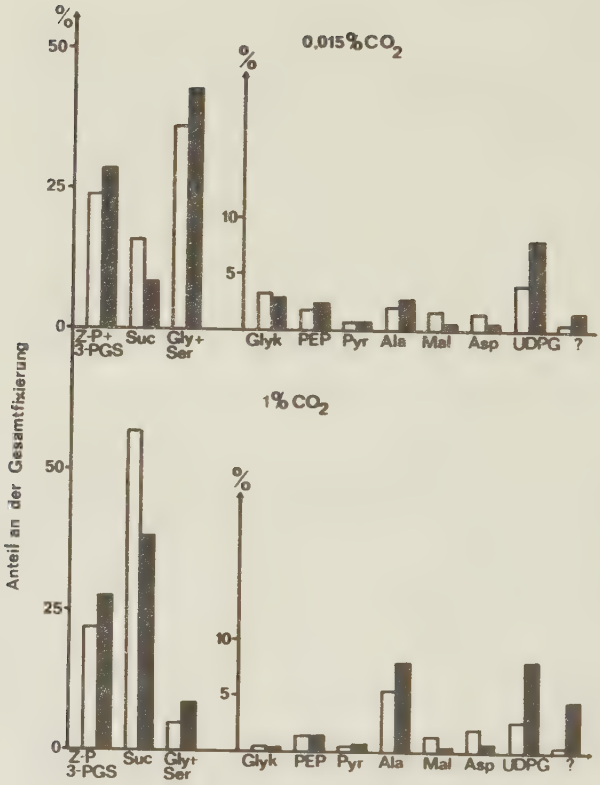

Abb. 18

Abhängigkeit des Fixierungsmusters von der CO_2-Konzentration

Versuchsbedingungen siehe Text. Substanzbezeichnungen siehe Legende zu Abb. 14, 15. Die Markierungsmuster des Kontrollmaterials sind durch weiße Blöcke, die des verdunkelten Materials durch schwarze Blöcke gekennzeichnet.

Insgesamt bringen diese Versuche den Hinweis, daß sich die erhöhte CO_2-Konzentration sowohl beim Kontroll- als auch beim verdunkelten Material auf die Umsetzungen auswirkt, so daß die Funktion der Schließzellen bei den vorliegenden Versuchen die Fixierungsmuster nur in begrenztem Umfang beeinflussen kann.

III.2.5. Die CO_2-Fixierung infiltrierter Blattstücke ohne untere Epidermis

Um einerseits die Spaltöffnungen als mögliche Diffusionsbarrieren völlig auszuschalten, zum anderen festzustellen, ob auch beim Spinat die Schließzellen über eine hohe Aktivität der PEP-Carboxylase die Fixierungsmuster entscheidend beeinflussen, wie es nach Willmer et al. (1973) durch Untersuchungen bei Commelina und Tulipa möglich erscheint, wurden Fixierungsexperimente mit Blattstücken ohne untere Epidermis durchgeführt. Das nach 30 Sekunden erhaltene Muster eines typischen Experiments ist in Abb.19 dargestellt. Die Verdunklungsdauer betrug hier 8 Tage. Bei niedrigen Sucrose-Aktivitäten überwiegen die Phosphatester und Glycin/Serin. Die Verbindungen der Lichtatmung sind beim verdunkelten Material erneut stärker vertreten. Die Markierung der C_4-Körper ist unabhängig von der Mitwirkung der unteren Epidermis recht hoch, die Kontrollpflanzen markieren höher als das verdunkelte Material.

Wie schon die Experimente mit unterschiedlichen CO_2-Konzentrationen vermuten ließen, sind die Spaltöffnungen als potentielle Diffusionsbarriere nicht für die veränderten Muster verantwortlich. Ein entscheidender Einfluß der PEP-Carboxylase der Schließzellen kann aus diesen Experimenten nicht abgeleitet werden.

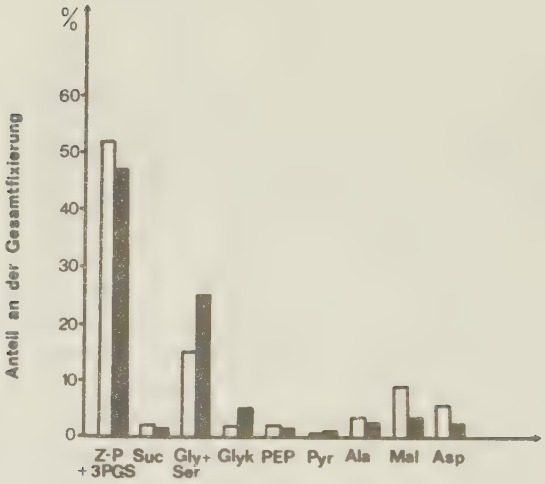

Abb. 19

Markierungsmuster infiltrierter Blattstücke ohne untere Epidermis
Versuchsbedingungen siehe Text. Substanzbezeichnungen siehe Legende zu Abb. 14, 15, Kennzeichnung des Materials wie bei Abb. 18.

III.2.6. Die Fixierungsrate von Blattstücken im Dunkeln.

Die bisher dargestellten Experimente zeigen im Bereich der Bildung von C_4-Säuren tiefgreifende Veränderungen beim verdunkelten Material an.

Unter der Voraussetzung, daß eine CO_2-Fixierung im Dunkeln weitgehend über die PEP-Carboxylase-Reaktion erfolgt und als Markierungsprodukte überwiegend C_4-Säuren entstehen, war für das verdunkelte Material eine verringerte CO_2-Dunkelfixierung zu erwarten.

Blattstücke vom Kontrollmaterial und von 8 Tage verdunkelten Pflanzen wurden in der völlig abgedunkelten Fixierungskammer mit markiertem CO_2 (0,05 %) 30 Sekunden inkubiert. Um das Material an die Versuchsbedingungen zu adaptieren, wurden die Blattstücke jeweils 30 Minuten bei Lufbegasung vorverdunkelt. Die gemessenen Fixierungsraten für Kontroll- und verdunkeltes Material lagen bei 0,2 bzw. 0,03 /u mol CO_2/h x g Frischgewicht. Als Hauptmarkierungsprodukte tauchten Malat und Aspartat auf. Phosphatester konnten nicht nachgewiesen werden.

III.3. Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf Enzymaktivitäten unter besonderer Berücksichtigung der Lokalisation in der Zelle.

Aus den in Abschnitt III.2. dargestellten Versuchsergebnissen hinsichtlich der unterschiedlichen Markierungskinetik von Metaboliten in intakten Blattgeweben kann bereits geschlossen werden, daß sich die langfristige Verdunklung auf einige Enzyme stärker auswirkt als auf andere. Insbesondere die Abnahme in der Markierung von Malat und Aspartat, deren Bildung im Zytoplasma angenommen werden kann (Ting und Osmond 1973 b; Ting 1971), führte im Vergleich zu den Intermediaten der CO_2-Assimilation und der Lichtatmung zu der Annahme, daß die verschiedenen Zellkompartimente eine unterschiedliche Beeinflussung erfahren. Geht man von der seit langem bekannten Tatsache des Proteinabbaues während der Verdunklung aus (Mothes, 1960; Yemm, 1965) und berücksichtigt die Lokalisation definierter Enzymproteine in den Zellkompartimenten, so müßte hinsichtlich der Aktivität von Leitenzymen eine unterschiedliche Abnahme erwartet werden. Um eine Bestätigung für diese Annahme zu erhalten, wurden vergleichende Aktivitätsmessungen für Enzyme aus dem Zytoplasma, den Plastiden und den Peroxisomen durchgeführt. Vorangestellt ist ein Kapitel über die Bezugsgröße, zumal diese mit der Verdunklung selbst zu einer variablen Größe werden kann.

III.3.1. Der Einfluß der Verdunklung auf die Bezugsgröße

Eines der ältesten pflanzenphysiologischen Probleme ist die Wahl der Bezugsgröße, die insbesondere bei der Auswertung von Versuchsergebnissen mit höheren Pflanzen intensive Diskussionen auslöste (Keyssner und Tauböck, 1933). Zu den am häufigsten herangezogenen zählen die Blattfläche und das Frischgewicht sowie der Protein- und der Chlorophyllgehalt. Eine Möglich-

keit, Änderungen dieser Größen bei physiologischen Variationen zu erfassen, ist durch die Aufstellung von Relationen gegeben.

Die größte Konstanz wurde bei den hier geschilderten Versuchen für das Verhältnis Blattfläche zu Frischgewicht erhalten. Beim Kontrollmaterial ergab sich eine Relation von 36,5 cm^2/g Frischgewicht $\pm$ 3,4, die auch in Blättern nach 11 Tagen Verdunklung ohne signifikante Änderung bestimmt wurde. Innerhalb dieser Verdunklungszeit blieb auch der Wassergehalt mit ungefähr 85 % konstant.

Vergleichsweise dazu wurden selbst für die Kontrollen erhebliche Variationen für den Protein- und den Chlorophyllgehalt gemessen. Obwohl das verwendete Blattmaterial aus Pflanzen stammte, die unter relativ konstanten Bedingungen angezogen worden waren, variierte in verschiedenen Serien der Proteingehalt der Kontrollen zwischen 9 und 16 mg/g Frischgewicht; der Chlorophyllgehalt streute zwischen 0,95 und 2 mg/g Frischgewicht. Diese Streuungen sind geringer, wenn Material aus einer Aussaat untersucht wird. Die Mittelwerte für den Protein- und Chlorophyllgehalt typischer Aussaaten wurden mit 14,3 $\pm$ 2 mg und mit 1,2 $\pm$ 0,35 mg/g Frischgewicht ermittelt.

Um Veränderungen während der Verdunklung bei verschiedenen Serien besser erfassen zu können, werden im weiteren die Werte des verdunkelten Materials als prozentuale Anteile der entsprechenden Kontrolle angegeben. Die Ergebnisse über den Einfluß der Verdunklung auf den Protein- und Chlorophyllgehalt in einer Reihe von Experimenten sind in Abb. 20 und 21 dargestellt.

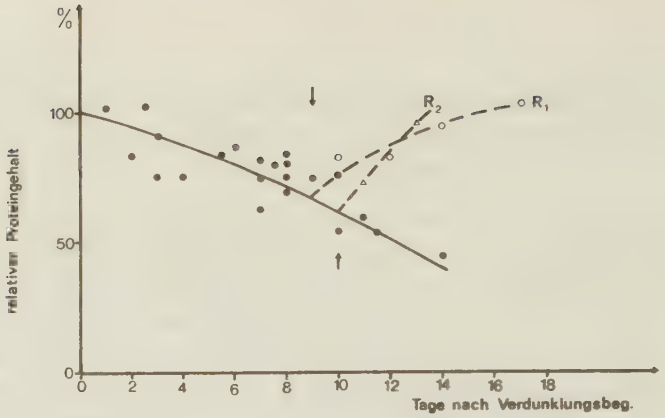

Abb. 20

Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf den Gehalt löslicher Proteine von Spinatblättern
Die Proteingehalte des verdunkelten Materials sind als prozentuale Anteile der entsprechenden Kontrolle angegeben. Die Pfeile geben den Beginn der Regeneration unter normalen Kulturbedingungen an. R_1 und R_2 zeigen den Verlauf von 2 Regenerationsserien.

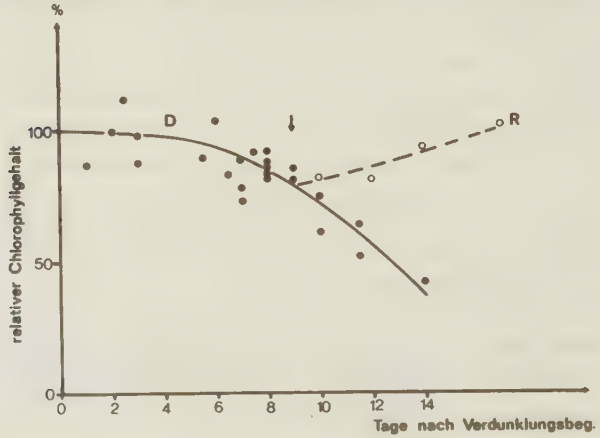

Abb. 21

Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf den Chlorophyllgehalt von Spinatblättern
Erklärungen wie bei Abb. 20

Der Proteinabbau begann bereits nach ein bis 2 Tagen Verdunklung und setzte sich über den gesamten Versuchszeitraum stetig fort. Nach 8 Tagen wurde relativ zur Kontrolle noch 76,5^{+}12 % bestimmt. Nach 14 Tagen Verdunklung liegt der Proteingehalt bei etwa 50 %. Werden die Pflanzen wieder in normale Kulturbedingungen überführt, so steigt die Proteinmenge wieder an und erreicht nach 4 bis 6 Tagen Regeneration die Werte des Kontrollmaterials.

Hinsichtlich des Chlorophyllgehaltes deuted sich, wie bereits Postius (1972) betont, über einen Verdunklungszeitraum von 8 Tagen eine größere Resistenz an (Abb.21), es zeigen sich noch Chlorophyllgehalte von 85^{+} 7,7 % der Kontrolle. Erst nach dieser Zeit setzte ein stärkerer Abbau ein, der nach 14 Tagen zu Chlorophyllgehalten von etwa 50 % führte. Diese Tendenz der im Vergleich zum Protein verzögerten Chlorophylldegradation zeigte sich bei jeder Aussaat, unabhängig von der absoluten Abnahme. In gleicher Weise wie für den Proteingehalt erfolgt auch hier eine Regeneration nach Überführung der Pflanzen in normale Kulturbedingungen. Nach einer Woche Regeneration wurden die Kontrollwerte wieder erreicht.

III.3.2. Der Einfluß der Verdunklung auf die Aktivität der RuDP-Carboxylase als Leitenzym der Chloroplasten.

Als spezifisches Leitenzym der Chloroplasten kann die RuDP-Carboxylase angesehen werden; sie nimmt im reduktiven Pentosephosphatzyklus eine Schlüsselstellung ein. Die Ergebnisse einer typischen Versuchsserie sind für die Aktivität der RuDP-Carboxylase in Abb.22 aufgezeichnet. Für die Kontrollen, die hier mit 100 %

angegeben sind, wurden Werte zwischen 165 und 200 µ mol fixiertes CO_2 / g Frischgewicht x Stunde mit einem Mittel von 180 µ mol CO_2 / g Frischgewicht x Stunde bestimmt. Die Aktivitätsabnahme ähnelt der Abnahme des Proteingehaltes, nach einer Woche Verdunklung deutet sich wie beim Chlorophyllgehalt ein verstärkter Abbau an. Bei 6 verschiedenen Aussaaten wurde nach 8 Verdunklungstagen ein Aktivitätsabfall auf 72 ± 6 % gemessen. Unter normalen Kulturbedingungen wurde innerhalb von 4 Tagen eine Regeneration der Aktivität auf 80 bis 90 % der Kontrolle erhalten.

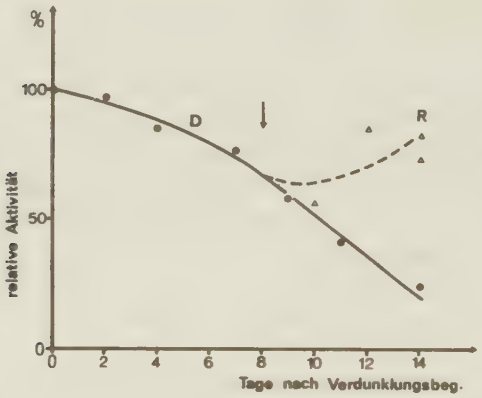

Abb. 22

Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf die Aktivität der RuDP-Carboxylase
Erklärung siehe Text und Legende zu Abb. 20

Da eine verminderte Aktivität des Enzyms nicht direkt mit einem Proteinabbau verknüpft sein muß, sondern durch Inaktivierung verursacht sein kann, ergibt sich die Frage, ob sich der relative Anteil des Enzymproteins am gesamten löslichen Protein ändert. Aus diesem Grunde wurde das Enzym über einen Sucrosedichtegradienten nach Goldthwaite et al. (1970) angereichert und der Aktivitätsabfall mit der Veränderung des Proteinanteils bestimmt. Da unabhängig von der Verdunklungsdauer die Fraktion, in der sich die RuDP-Carboxylase befand, etwa 35 % des gesamten löslichen Proteins darstellte, läßt sich der Aktivitätsabfall mit einem Abbau des Enzymproteins erklären. Bei einem einseitig bevorzugten Abbau in einem anderen Kompartiment und einer Stabilität der Plastidenenzyme müßte die spezifische Aktivität der RuDP-Carboxylase ansteigen.

III.3.3. Der Einfluß der Verdunklung auf die Aktivität der PEP-Carboxylase.

Die Testbedingungen:

Sowohl für Rohextrakte aus Kontrollmaterial als auch aus verdunkelten Pflanzen zeigt sich gleichermaßen eine Abhängigkeit der Aktivität von den gewählten Testmethoden. So liegen bei einer Kopplung der PEP-Carboxylase-Reaktion mit der MDH-Reaktion die Einbauraten an markiertem Kohlenstoff höher als bei Bestimmungen, bei denen die gebildete Oxalessigsäure als Osazon abgefangen wird, Tabelle 4.

Tabelle 4

Die Beeinflussung der enzymatischen Aktivität im Rohextrakt durch NADH

Material	Testbedingungen	Aktivität	Aktivität K / Aktivität D
K	+ NADH, MDH	0,60	2,13
D	+ NADH, MDH	0,28	
K	- "	0,425	2,0
D	- "	0,21	

Es bedeuten: K = Kontrollmaterial, D = verdunkeltes Material (8 Tage). Die Aktivitäten sind in /u mol HCO_3^-/ min x g Frischgewicht angegeben. Bei der Berechnung der Einbauraten wurde eine mögliche Verdünnung der spezifischen Aktivität des eingesetzten $H^{14}CO_3^-$ durch CO_2 aus der Luft nicht berücksichtigt. Für die angewendeten Versuchsbedingungen würde eine Berechnung unter Einbeziehung der bei Bassham et al. (1974) angegebenen CO_2-Absorption aus der Luft zu einer Steigerung der Einbauraten um den Faktor 1,4 führen. Da die Aktivitätserhöhung durch die Kopplung der MDH-Reaktion, sie wird von Coombs et al. (1973a) als Hinweis für eine Oxalacetathemmung des Enzyms gedeutet, unabhängig von Material war, wurde bei Versuchsreihen der technisch einfachere optische Test mit der MDH-Reaktion angewendet.

Eine Veränderung des pH-Optimums der PEP-Carboxylase während der Verdunklung zeigte sich nicht. Zwischen pH 7,2 und 8,0 blieben die Aktivitäten nahezu unverändert.

Bei der Bestimmung der PEP-Carboxylase ist nicht auszuschließen, daß eine PEP-Carboxykinase-Reaktion stört.

Im Rohextrakt könnte über endogene Nucleotide wie ATP und ADP bei Verknüpfung mit einer Myokinase-Reaktion eine Bildung von Oxalacetat aus PEP und HCO_3^- unabhängig von der PEP-Carboxylase erfolgen. Unter den angegebenen Testbedingungen ließ sich jedoch niemals eine PEP-Carboxykinase-Reaktion nach ADP-Zusätzen zum PEP-Carboxylase-Test nachweisen. Dieser Befund sichert gleichzeitig den Pyruvat-Kinase-Test gegen Nebenreaktionen. Da die Rohextrakte keine LDH-Aktivitäten zeigten, stört eine Hydrolyse des PEP zum Pyruvat durch Phosphatasen bei hohen PEP-Konzentrationen die PEP-Carboxylase-Bestimmung ebenfalls nicht.

Aktivität und Verdunklungsdauer:

Verfolgt man die PEP-Carboxylase-Aktivität während der Verdunklung, so erhält man den in Abb. 23 dargestellten Verlauf. In dieser Abbildung sind die Daten von 6 Verdunklungsreihen zusammengefaßt. Die Mittel der Kontrollraten lagen dabei zwischen 0,5 und 1,25 /u mol HCO_3^-/min x g Frischgewicht. Bereits am zweiten Verdunklungstag zeigt sich ein Aktivitätsabfall, der nach 14 Tagen die Aktivität auf etwa 13 % der Kontrolle absinken ließ. Bei 10 Verdunklungsreihen ergaben sich nach 8 Verdunklungstagen Raten, die zwischen 23 und 55 % der Kontrollen lagen. Im Mittel betrugen die Raten 41 %. Zwei Regenerationsreihen nach 9 und 11 Tagen Verdunklung zeigten, daß diese Veränderungen des verdunkelten Materials reversibel sind. Nach etwa einer Woche wurden die Raten des Kontrollmaterials wiedererlangt.

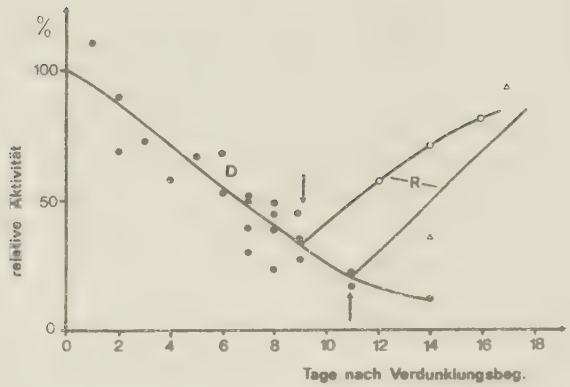

Abb. 23

Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf die Aktivität der PEP-Carboxylase
Erklärung siehe Text und Legende zu Abb. 20

Kinetische Eigenschaften des Enzyms im Rohextrakt:

Um einerseits bei nicht völlig sättigenden PEP-Konzentrationen die maximale Aktivität zu ermitteln und andererseits Anhaltspunkte darüber zu erhalten, ob die Aktivitätsminderung während der Verdunklung mit einer Änderung der kinetischen Eigenschaften des Enzyms verbunden ist, wurden bei verschiedenen PEP-Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt und ein Lineweaver-Burk-Diagramm angefertigt; Abb.24 zeigt ein typisches Experiment.

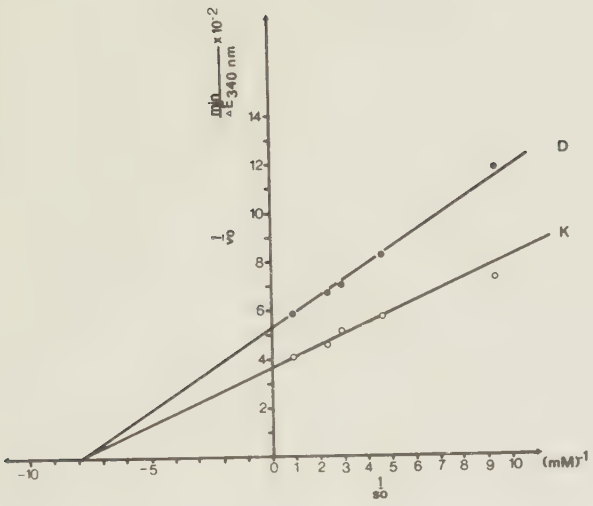

Abb. 24

Abhängigkeit der Enzymaktivität der PEP-Carboxylase von der PEP-Konzentration. Doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk
Es bedeuten K = Kontrollmaterial, D = verdunkeltes Material

Unter den gewählten Versuchsbedingungen ergaben sich zwischen Kontrollmaterial und verdunkelten Pflanzen (6 Tage dunkel) praktisch keine Unterschiede in den apparenten K_m-Werten für PEP. Bei doppelt reziproker Auftragung zeigte sich eine lineare Abhängigkeit von $1/s_o$ und $1/v_o$. Die Mittelwerte von 7 Experimenten bei

verschiedenen Versuchsreihen ergaben beim Kontrollmaterial einen K_m-Wert von $0,104 \pm 0,025$ und beim verdunkelten Material $0,11 \pm 0,022$ mM. Sowohl vom kinetischen Verhalten des Enzyms bei hohen PEP-Konzentrationen als auch von den K_m-Werten stimmen diese Ergebnisse mit Angaben über Atriplex hastata überein, Ting, Osmond (1973a). Ausgeprägte allosterische Effekte des Enzyms treten wohl erst im Bereich niedriger PEP-Konzentrationen auf.

III.3.4. Der Einfluß der Verdunklung auf die Aktivität einiger Glykolyse-Enzyme

Die Tabelle 5 gibt die enzymatischen Aktivitäten der Phosphoglyceromutase, der Enolase und der Pyruvat-Kinase beim Kontrollmaterial und dem 8 Tage verdunkelten Material an.

Tabelle 5

Die Aktivitätsabnahme einiger Glykolyse-Enzyme nach 8 Verdunklungstagen.

Enzym	Kontrollaktivität	Aktivit.d.verd.Mat.in % d.Kontr.
PGM	$2,32 \pm 0,35$	45 ± 5 %
Enolase	$0,92 \pm 0,08$	55 ± 6 %
Pyr.-Kin.	$0,62 \pm 0,15$	65 ± 6 %

Die Kontrollaktivitäten sind in /u mol Substrat/ min x g Frischgewicht angegeben. Die Meßwerte stammen von 4 verschiedenen Versuchsreihen. Die PGM zeigt einen ähnlichen Abfall der Aktivität wie die PEP-Carboxylase, im Vergleich war jedoch ohne Ausnahme festzustellen, daß der Abfall der PEP-Carboxylase-Aktivität stets dem Abfall der PGM sowie allen anderen getesteten Enzymen vorauseilte.

Bei einer ebenfalls niedrigeren Enolase-Aktivität und einer relativ hohen Pyruvat-Kinase-Aktivität läßt sich aus den Ergebnissen eine Einschränkung der PEP-Bereitstellung aus C_3-Körpern der Chloroplasten vermuten. Die um PEP konkurrierende Pyruvat-Kinase erfährt im Gegensatz zur PEP-Carboxylase nur einen geringen Abbau.

III.3.5. Der Einfluß der Verdunklung auf die Aktivität von zwei peroxisomalen Enzymen.

Die Tabelle zeigt das Verhalten von Glykolat-Oxidase und Glyoxylat-Reduktase (NADH-abhängig) aus den Peroxisomen (Tolbert et al., 1968) nach 8 Tagen Verdunklung.

Tabelle 6

Die Aktivitäten von Glykolat-Oxidase und Glyoxylat-Reduktase nach 8 Tagen Verdunklung.

Enzym	Kontrollaktivit.	Aktivit.d.verd.Mat.in % d.Kont.
Glykolat-Ox.	0,44± 0,06	71± 5 %
Glyoxyl.-Re.	0,43± 0,15	55± 4 %

Zur Erläuterung siehe Tabelle 5.

Die NADH-abhängige Glyoxylat-Reduktase zeigt hier eine stärkere Labilität gegenüber der Verdunklung als die Glykolat-Oxydase. Bei der Glyoxylat-Reduktase muß allerdings berücksichtigt werden, daß die gemessenen Raten keine Maximalraten sind, da nicht im pH-Optimum von etwa 6,5 gemessen wurde.

IV Diskussion

Bei Untersuchungen mit isolierten Chloroplasten aus verdunkelten Spinatpflanzen fanden Postius und Jacobi (1971) und Postius (1972 a,b) einen starken Abfall der NADP-Reduktion innerhalb von sehr kurzen Verdunklungszeiten. Da durch Zusatz von gereinigten Enzymen, die die terminale Stufe der NADP-Reduktion katalysieren, das System regeneriert werden konnte, wurde gefolgert, daß die Potenz für die photochemische Reduktion erhalten blieb. Der Bedarf an Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase zur Aufrechterhaltung der NADP-Reduktion führte zu der Annahme, daß diese Enzyme teilweise abgebaut oder inaktiviert wurden.

Die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der CO_2-Fixierung und der Markierung der Assimilationsintermediate stehen mit den genannten Befunden zunächst nicht in Einklang, da zu Verdunklungszeiten, wo die NADP-Reduktion ohne Zusätze kaum nachzuweisen war, noch etwa 75 % der Fixierungskapazität gemessen wurde (Abb. 6). Dieses Ergebnis konnte aber nur dann erhalten werden, wenn bestimmte Bedingungen eingehalten wurden. Grundsätzliche Unterschiede bestanden vor allem in der Vorbelichtung des Blattmaterials und in der Verwendung von intakten Chloroplasten. Im Gegensatz zur CO_2-Fixierung müssen bei Messungen des Elektronentransportes aufgebrochene Chloroplasten verwendet werden, da die Chloroplastenhülle für Elektronenakzeptoren wie NADP weitgehend impermeabel ist. Obwohl die Unterschied in der Präparation und in den zum Versuch kommenden Chloroplastenzuständen Gründe für die abweichenden Ergebnisse sein können, muß besonders der Vorbelichtung eine entscheidende Rolle eingeräumt werden.

Bei Chloroplasten aus verdunkelten Blättern ohne Vorbelichtung wurde außer der vergrößerten lag-Phase eine stark erniedrigte Rate der CO_2-Fixierung und eine verminderte Markierung der reduzierten Metabolite relativ zur 3-PGS gefunden (Abb. 3, 13, Kapitel III.1.8.). Dies deutet auf geringe und begrenzende Aktivitäten der NADP-abhängigen GAPDH hin, für die von Ziegler et al. (1968) und Müller (1970) eine Lichtaktivierung beschrieben wurde. Durch die Befunde von Postius kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch die terminale Stufe der NADP-Reduktion eine Lichtaktivierung erfahren kann. Zusätzlich muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß die Enzyme bei einer verminderten Bindung an der Membran durch den hypotonischen Schock freigesetzt werden können, zumal Versuche von Berzborn mit Antikörpern (1968) Hinweise für die Lokalisation der Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase an der Oberfläche der Thylakoide brachten. Obwohl dieses Enzym in Chloroplasten aus normalen Blättern fest gebunden ist, kann es durch EDTA freigesetzt und durch Mg^{++} an der Struktur stabilisiert werden. In diesem Zusammenhang erscheinen Arbeiten von Lin und Nobel (1971) bedeutungsvoll, die zeigen, daß ein lichtinduzierter Kationenflux vom Zytoplasma in die Chloroplasten stattfindet. Während der Belichtung von Blättern reichern die Chloroplasten aus dem umgebenden Zellräumen Mg^{++} an. Neben Einflüssen auf den strukturellen Zusammenhalt von Membrankomponenten (siehe auch Strotmann, 1971) ist durch eine erhöhte Konzentration von Mg^{++} eine Aktivierung von Enzymen des reduktiven Pentosephosphatzyklus zu erwarten. Dies gilt besonders für die RuDP-Carboxylase, die Ribulokinase und die FDPase. Ein weiterer Grund für die durch Vorbelichtung erreichte Aktivierung ist in der Anlieferung von Intermediaten des reduktiven Pentose-

phosphatzyklus zu suchen, die zur Regeneration des CO_2-Akzeptors führen (Walker, 1973). Es bestehen Hinweise, daß veränderte Metabolitgehalte nicht allein hinsichtlich der Bereitstellung des CO_2-Akzeptors von Bedeutung sind, sondern im Falle des Fruktose-6-Phosphats auch die Aktivität bestimmter Zyklus-Enzyme stimulieren können (Buchanan und Schürmann, 1972). Somit sind es eine Reihe von Faktoren, die in komplexer Weise zur Lichtaktivierung führen und die zum Teil aus dem Zytoplasma aufgenommen und zum Teil im Chloroplasten synthetisiert werden. Dieses Zusammenspiel erklärt auch die Tatsache, daß eine Belichtung der isolierten Chloroplasten die Vorbelichtung der Blätter nicht ersetzen kann.

Eine von kurzfristigen Aktivierungsphänomenen unabhängige Aussage über den Einfluß der langfristigen Verdunklung auf den Stoffumsatz im Bereich der CO_2-Assimilation kann somit erst dann gemacht werden, wenn die Messungen im steady state erfolgen. Unter diesen Bedingungen wird der Durchsatz bei gleichbleibendem Aktivierungsgrad weitgehend durch die endogene Konzentration der einzelnen Enzyme des Zyklus bestimmt. Erfahren diese Enzyme während der Verdunklung möglicherweise einen unterschiedlichen Abbau, dann sollte das eine quantitative Änderung im Fixierungsmuster ergeben.

Vergleiche der Fixierungsmuster von Kontrollen mit Chloroplasten aus langfristig verdunkeltem Material zeigten im steady state qualitativ keine Unterschiede. Quantitative Differenzen ergaben sich jedoch in der Markierungsintensität von DHAP, die insbesondere unter mehr alkalischen Versuchsbedingungen bei den Chloroplasten aus verdunkelten Blättern signifikant größer war (Abb. 12 a).

Bei der Bewertung dieser Unterschiede in der DHAP-Markierung von isolierten Chloroplasten drängt sich zunächst ein Vergleich mit den Markierungsmustern der intakten Blattgewebe auf. Die isolierten Chloroplasten zeigen dabei generell eine höhere Markierung von DHAP, wie es bereits früher von Jensen und Bassham (1966) und auch von Grant et al. (1972) beschrieben wurde (Abb. 14, 15; Kapitel III.2.1.). Der Austritt von DHAP in das Fixierungsmedium spielt hier eine entscheidende Rolle.Versuche von Bassham et al. (1968) brachten Hinweise dafür, daß über 95 % von DHAP aus den Chloroplasten austreten und sich im Medium bei stark eingeschränkten Umsetzungen als artifizielles Endprodukt anhäufen.

Im Hinblick auf die Energieversorgung der Zelle ist ein spezifischer Transport von DHAP aus den Chloroplasten in das Zytoplasma von Bedeutung. Experimente von Heber et al. (1967) geben dafür eindeutige Belege. Im Rahmen des von Walker und Crofts (1970) postulierten DHAP/3-PGS-shuttle kann DHAP aus den Chloroplasten als Transportmetabolit von Reduktionsäquivalenten und "energiereichen" Bindungen dienen. Im Zytoplasma aus DHAP gebildete 3-PGS kann über spezifische Translokase-Systeme wieder in den Chloroplasten gelangen und dort erneut unter Verbrauch von photosynthetisch gebildetem ATP und NADPH zu DHAP umgewandelt werden.

Obwohl, wie oben gezeigt, die Konzentration von DHAP in entscheidendem Maß von Transportvorgängen abhängig ist, kann eine Hemmung des DHAP-Umsatzes innerhalb der isolierten Chloroplasten aus verdunkeltem Material nicht ausgeschlossen werden. Hinsichtlich einer partiellen Hemmung des DHAP-Stoffwechsels muß weniger

eine Beeinflussung der Aldolase als eine eingeschränkte Aktivität der FDPase diskutiert werden. In vergleichenden Untersuchungen über die verschiedenen Enzyme des reduktiven Pentosephosphatzyklus in Chloroplastenextrakten zeigte sich, daß die Aktivität der Aldolase die der FDPase weit übertrifft (Gibbs, 1971). Berücksichtigt werden muß bei solchen Vergleichen allerdings, daß die in Extrakten gemessenen Aktivitäten sowie die Eigenschaften der Enzyme nicht den Verhältnissen entsprechen müssen, wie sie in vivo bestehen. Gerade für die FDPase wiesen Garnier und Latzko (1972) nach, daß die Aktvivtät entscheidend von den Isolationsbedingungen abhängt. Der FDPase wird auf Grund einer Vielzahl von Aktivierungsphänomenen und der Irreversibilität der von ihr katalysierten Reaktion eine entscheidende Rolle bei der Regulation des reduktiven Pentosephosphatzyklus zugeschrieben (Pedersen et al., 1966; Bassham et al., 1966; Bassham et al., 1970; Bassham, 1971; Buchanan und Schürmann, 1972; Heldt et al., 1973). Darüber hinaus soll nach Heldt et al. (1973) das Enzym an der Regulation des Transportes von DHAP in das Zytoplasma beteiligt sein.

Eine Aktivitätsabnahme der FDPase beim verdunkelten Material sollte neben einem Anstieg von DHAP insbesondere eine vermehrte Aktivität von FDP verursachen. Im Vergleich dazu müßte die Markierung der Hexosemonophosphate vermindert sein. Wie die in Abb. 7 und 12a,b aufgezeichneten Ergebnisse zeigen, trifft dies nicht zu. Da mit dem Anstieg des pH-Wertes das Verhältnis von Zuckermonophosphaten zu Zuckerdiphosphaten unabhängig vom Material steigt (Tab. 2), könnte eine pH-abhängige Aktivierung der FDPase abgeleitet werden, zumal für das Enzym in Abhängigkeit von der Mg^{++}-Konzentration

hohe pH-Optima beschrieben wurden (Heldt et al., 1973; El-Badry, 1974). Sowohl die bereits erwähnte lichtabhängige Aufnahme von Mg^{++} (Lin und Nobel, 1971) wie auch der von Heldt et al. (1973) nachgewiesene Einfluß des pH-Wertes des Reaktionsmediums auf die aktuelle Protonenkonzentration im Stroma lassen die Folgerung zu, daß unter alkalischen Bedingungen die FDPase eine relativ hohe Aktivität aufweist. Obwohl die Fixierungskapazität in Chloroplasten aus verdunkeltem Material insgesamt zwar absinkt, läßt die quantitative Auswertung der Markierung der einzelnen Intermediate nicht den Schluß zu, daß eines der Zyklus-Enzyme besonders durch die Verdunklung beeinflußt wird. Wie bereits angedeutet, lassen sich eher Transportphänomene oder veränderte Permeabilitätseigenschaften der Chloroplastenhülle als Ursache für die erhöhte DHAP-Markierung beim verdunkelten Material vermuten.

Nach Arbeiten von Moore et al. (1969) sowie von Bassham et al. (1970) wird die DHAP-Markierung isolierter Chloroplasten sehr stark von einem Proteinfaktor aus FDPase-Präparationen des Spinats im Zusammenwirken mit Mg^{++} beeinflußt. Innerhalb bestimmter Konzentrationen erhöhen die beiden Faktoren den DHAP-Export in das Fixierungsmedium. Es erscheint möglich, daß beim verdunkelten Material eine verstärkte Wirksamkeit des Proteinfaktors besteht. Hier nicht gesondert aufgeführte Markierungsmuster der CO_2-Fixierung bei höheren Mg^{++}-Konzentrationen zeigten eine Erhöhung der Markierung von DHAP und eine Erniedrigung von 3-PGS. Es liegt daher nahe, für die hier verwendeten Chloroplastenpräparationen ebenfalls ein Vorhandensein des genannten Proteinfaktors anzunehmen. Es muß offen bleiben, ob der Proteinfaktor und Mg^{++} das von Heldt und Rapley (1970) beschriebene Translokase-System beeinflussen, oder ob zusätzliche

Permeabilitätsveränderungen bewirkt werden.Das erwähnte Translokase-System kann im Gegentausch DHAP,3-PGS und anorganisches Phosphat zwischen Chloroplasten und Umgebung transportieren und somit die Stoffumsätze während der Photosynthese in entscheidendem Maße regulieren.

Bei allen Betrachtungen dieser Art muß jedoch offen bleiben, ob derartige an isolierten Organellen nachgewiesenen oder diskutierten Veränderungen unmittelbar in die Zelle übertragen werden können.Präparationsartefakte,wie auch die nicht unmittelbar vergleichbaren Verhältnisse im Fixierungsmedium und im Zytoplasma schränken die Projektion in das Zellgeschehen ein. So lassen die Ergebnisse von Kap. II.2. keinen eindeutigen Schluß zu, welche Bedeutung der erhöhte Transport von DHAP bei den isolierten Chloroplasten in vivo für das verdunkelte Material hat.

Die Ergebnisse von Kap. II.2. und III.3. weisen darauf hin, daß während der Verdunklung zuerst zytoplasmatische Reaktionen in ihrer Akcivität absinken.Diese Ergebnisse stehen mit Angaben von Martin und Thimann (1972) in Einklang, die eine Synthese von hydrolytischen Enzymen im Zytoplasma annehmen.

Eine quantitative Auswertung der Fixierungsmuster von Blattstücken (Kap. III.2.)zeigt,daß in verdunkeltem Material eine Hemmung in der Synthese von C_4-Säuren und eine stimulierte Bildung von Intermediaten der Lichtatmung eintritt.Der Umsatz dieser Verbindungen erfolgt in extraplastidiären Zellräumen.Vorstufen der entsprechenden Reaktionsketten sind jedoch Substanzen,die in den Chloroplasten gebildet werden können.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse über den ^{14}C-Einbau in Blattstücke müssen neben Umsetzungen der markierten Intermediate aus den Chloroplasten in den übrigen Zellräumen noch zusätzliche Carboxylierungsreaktionen berücksichtigt werden.Bereits ältere Untersuchungen von Benson und Calvin (1950) sowie von Bassham et al (1950) zeigten,daß sich ein hoher Anteil von ^{14}C schon nach kurzer Fixierungszeit im C-Atom 4 von Malat und Aspartat befindet.Für Spinat und andere C_3-Pflanzen wurden bisher eine Reihe von Carboxylierungsreaktionen beschrieben,

die zu markierten C_4-Körpern führen.
Für diese Carboxylierungen kommen im wesentlichen drei Enzyme in Frage:

1) PEP-Carboxylase (E.C.4.1.1.31)

$$PEP + CO_2 \xrightarrow{Mg^{++}} \text{Oxalacetat} + \text{anorg. Phosph.}$$

2) PEP-Carboxykinase (E.C.4.1.1.32)

$$PEP + CO_2 + ADP \xrightleftharpoons{Mg^{++}} \text{Oxalacetat} + ATP$$

3) Malatenzym (malic enzyme, E.C.1.1.1.40)

$$CO_2 + \text{Pyruvat} + NADPH \xrightleftharpoons{Mn^{++}} \text{Malat} + NADP^+$$

Die beiden erstgenannten Reaktionen führen zum Oxalacetat, das entweder über MDH zu Malat reduziert wird oder über eine Transaminase zum Aspartat führt. Im Gegensatz zur PEP-Carboxylase-Reaktion ist die Kinase-Reaktion reversibel. Das Malatenzym scheint für die Carboxylierung weniger bedeutungsvoll zu sein. Bucke und Long (1971) fanden bei Spinat etwa ein Drittel der Aktivität im Vergleich zur PEP-Carboxylase, Chen et al. (1971) zeigte bei Festuca, daß Malatenzym die Reaktion in Richtung Pyruvat etwa 30mal schneller katalysiert als in Richtung Malat. Vergleicht man die Literatur, so muß nach fast allen Befunden der PEP-Carboxylase beim Spinat die dominierende Rolle für die im Zytoplasma ablaufende CO_2-Fixierung zugesprochen werden (Bandurski und Greiner, 1953; Mazelis und Vennesland, 1957; Ting und Osmond, 1973 a,b). Lediglich vereinzelt wurde über das Vorkommen von PEP-Carboxykinase berichtet (Edwards et al., 1971), was jedoch in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte, da im kombinierten optischen Test nach Zugabe von ADP keine Stimulierung der Reaktionsgeschwindigkeit gemessen wurde.

Sowohl die eigenen Untersuchungen wie auch eine große Zahl von Studien an verschiedenen Objekten sprechen für eine Labilität der PEP-Carboxylase unter physiologischen Variationen. So wurde beim Mais, einer typischen C_4-Pflanze, ein drastischer Aktivitätsabfall bei Überführung der Pflanzen in niedere Lichtintensitäten gefunden (Hatch et al., 1969). Neben dem Einfluß der Belichtung beeinflußt bei C_4-Pflanzen auch der Entwicklungszustand die Aktivität (Khanna und Sinha, 1973; Kennedy und Laetsch, 1973). Die starke Variabilität ist jedoch nicht nur auf C_4-Pflanzen beschränkt, sondern zeigt sich auch bei niederen Formen und bei C_3-Pflanzen. In Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit aufgeworfenen Problem ist es vor allem von Interesse, daß die PEP-Carboxylase nach Verdunklung oder während der Seneszenz ein schnelles Absinken zeigt. Der Einfluß der Verdunklung wurde von Ogasawara und Miyachi (1971) für Chlorella und von Steup (1972) für Massenkulturen von Chlamydomonas beschrieben. Angaben für eine altersbedingte Aktivitätsabnahme bei C_3-Pflanzen wurden von Hawker (1969) für Weinbeeren, von Kisaki et al. (1973) für Tabak und von Downton und Slatyer (1971) für Atriplex hastata gemacht. Diese Befunde stimmen insgesamt mit den eigenen überein, zumal nicht nur während der Verdunklung, sondern auch im vergilbenden Blatt drastische Aktivitätsverluste beim Spinat gefunden wurden (unveröffentlicht).

Obwohl der in Kapitel III.2. nachgewiesene Markierungsabfall der C_4-Körper sich zu einem erheblichen Teil aus dem Aktivitätsabfall der PEP-Carboxylase erklären läßt, müssen für die Abläufe in vivo noch andere Faktoren berücksichtigt werden. Die im Rohextrakt gemessene Aktivität braucht nicht unbedingt allein ein Ausdruck für den verminderten Umsatz zu sein. Dies gilt vor

allem für jene Enzyme, deren Substrate Schlüsselstellungen im Stoffwechsel einnehmen. Der größte Teil dieser Enzyme unterliegt einer allosterischen Regulation, wie sie von Coombs et al. (1973 a) für die PEP-Carboxylase beschrieben wurde.

Für die Beurteilung einer verminderten Markierung müssen die folgenden Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

1) eine verringerte Aktivität des Enzyms,
2) ein geringeres Substratangebot; dabei können Störungen der Enzyme, die das Substrat anliefern oder verstärkte Konkurrenzreaktionen eine Rolle spielen,
3) das Auftreten von Hemmstoffen oder allosterischen Faktoren unter veränderten physiologischen Bedingungen.

Da nach 8 Verdunklungstagen die PEP-Carboxylase etwa 40 % der Kontrollaktivität erreicht (Abb. 23), die Markierung der C_4-Körper jedoch beträchtlich stärker absinken kann (Abb. 17), beeinflussen neben dem ersten Punkt weitere Faktoren das Muster.

Eine zusätzliche Bedeutung muß daher einer geringeren Substratkonzentration zugesprochen werden, die sich sowohl aus der Aktivitätsabnahme der Phosphoglyceromutase als auch der Konkurrenz mit der Pyruvat-Kinase erklären läßt (Tab. 5). PEP-Carboxylase und Pyruvat-Kinase konkurrieren im gleichen Zellraum um PEP. Bei vergleichbaren apparenten Km-Werten für PEP bei beiden Enzymen (Duggleby und Dennis, 1973; Ohmann, 1969) läßt sich bei ausreichenden ADP-Konzentrationen (vergleiche Macnicol, 1973) für das verdunkelte Material ein verstärkter Umsatz von PEP durch die Kinase ableiten, da die Kinase während der Verdunklung stabiler bleibt

als die PEP-Carboxylase. Eine entscheidende Stützung für diese Auffassung könnte jedoch nur durch Bestimmungen der verschiedenen pool-Größen und der spezifischen Aktivitäten unter den entsprechenden physiologischen Bedingungen erbracht werden.

Da zur Bildung von Malat aus dem Reaktionsprodukt der PEP-Carboxylase Reduktionsäquivalente erforderlich sind, könnte die niedrige Malat-Markierung auch durch einen Mangel an NADH verursacht werden. Baldry et al. (1969) diskutierten eine solche Abhängigkeit der Malatbildung bei C_4-Pflanzen. Für den Spinat liegen für diese Annahmen jedoch keine Anhaltspunkte vor, da sich die Aktivität der MDH während der Verdunklung kaum ändert (Ch. Postius, unveröffentlicht) und aus der hohen DHAP-Markierung bei den isolierten Chloroplasten in Verbindung mit dem verstärkten Ausstrom von DHAP kein Mangel an Reduktionsäquivalenten angenommen werden kann.

Hinsichtlich der Bildung von regulativen Intermediaten und Hemmstoffen lassen sich auf Grund von fehlenden Metabolitbestimmungen keine Aussagen machen. Experimente von Ting und Osmond (1973 a) und Goatly und Smith (1974) zeigen für die PEP-Carboxylase aus C_3-Pflanzen eine geringere Empfindlichkeit für bestimmte allosterische Effektoren als für das Enzym aus C_4-Pflanzen.

Aus den in Kapitel III.2. dargestellten Ergebnissen geht hervor, daß neben der Abnahme der Markierung von C_4-Körpern die Lichtatmung in den langfristig verdunkelten Blättern stimuliert wird. Wenn die Blattstücke nach einer Vorbelichtung mit $^{14}CO_2$ gefüttert wurden, zeigte sich ein deutlicher Anstieg von Glycin/Serin (Abb. 17).

Eine entscheidende Rolle für die Markierung von Intermediaten der Lichtatmung, deren Biosynthese in den Peroxisomen und Mitochondrien erfolgte (Tolbert, 1971), hat die CO_2-Konzentration. Wie aus Abb. 18 entnommen werden kann, sinkt die Markierung von Glycin/Serin und auch von Glykolat mit steigender CO_2-Tension ab. Dieser Befund erklärt sich aus den für die Lichtatmung beschriebenen Voraussetzungen, wonach die Produktion von Glykolat und Folgeprodukten hohe Lichtintensitäten, hohe O_2-Tensionen und geringe CO_2-Konzentrationen erfordert (s. a. Jackson und Volk 1970).

Für die Versuche mit intakten Geweben muß somit die endogene Konzentration an CO_2 und an HCO_3^- berücksichtigt werden. Aus den Versuchen mit unterschiedlichen CO_2-Tensionen der Luft und insbesondere den Experimenten mit infiltrierten epidermisfreien Blattstücken kann gesagt werden, daß die Stomata im verdunkelten Material keine Barriere für die CO_2-Versorgung darstellen. Für die Beurteilung der unterschiedlichen Markierung der Intermediate kommt jedoch hinzu, daß schwer abzuschätzende endogene pH-Verschiebungen über ein verändertes CO_2/HCO_3^- Gleichgewicht das Substratangebot variieren können und sich somit ebenfalls auf das Markierungsmuster auswirken. Unabhängig von dem Problem eines unterschiedlichen Zellzustandes der Kontrollen und der Blätter von verdunkelten Pflanzen stellt sich aber die Frage nach der Ursache der stärkeren Markierung im Glycin/Serin nach Verdunklung. Dieser Anstau könnte sowohl durch eine verstärkte Produktion von Glykolat als auch durch eine Hemmung der Folgereaktionen bedingt sein.

Eine Stimulierung der Lichtatmung durch ein höheres Angebot an Glykolat kann ausgeschlossen werden, da, wie die Versuche mit isolierten Chloroplasten zeigten (Abb. 12c), insbesondere unter alkalischen Bedingungen kaum Unterschiede in der Markierung von Glykolat zwischen Kontrollen und verdunkeltem Material bestehen. Hinzu kommt, daß sich auch die Glykolat-Oxidase nach Verdunklung nur wenig ändert (Tab. 6).

Der Grund für den Anstau von Glycin/Serin wird mehr in einer Hemmung des Serin-Umsatzes über Hydroxypyruvat zum Glycerat gesucht. Die Reduktion von Hydroxypyruvat zu Glycerat wird von der Glyoxylat-Reduktase katalysiert. Dieses Enzym reduziert 2 Substrate mit unterschiedlichen kinetischen Charakteristika: Glyoxylat und Hydroxypyruvat (Kohn und Warren, 1970). Die apparente Michaeliskonstante ist für Glyoxylat wesentlich höher als für Hydroxypyruvat, so daß in vivo das Enzym für die Reduktion von Hydroxypyruvat verantwortlich ist. Über die verminderte Enzymaktivität hinaus (Tab. 6) muß für die Aktivitätsabnahme noch ein verminderter Spiegel an Reduktionsäquivalenten in Betracht gezogen werden. Die Peroxisomen enthalten eine Malat-Dehydrogenase, durch die NADH angeliefert wird (Beevers, 1971). Die eingeschränkte Malat-Synthese im Zytoplasma in verdunkelten Blättern kann zusätzlich für den gehemmten Umsatz von Hydroxypyruvat verantwortlich sein.

Eine gewisse Bestätigung erfahren die hier angedeuteten Beziehungen durch die Tatsache, daß auch bei alternden Tabakblättern neben einer geringen Malat-Markierung ein Anstieg in der Markierung von Lichtatmungsintermediaten nach $^{14}CO_2$-Fixierung gefunden wurde (Kisaki et al., 1973).

V Zusammenfassung

1. An isolierten Chloroplasten aus Blättern von langfristig verdunkelten Spinatpflanzen wurde die Fixierung und das Markierungsmuster nach Applikation von $^{14}CO_2$ untersucht.

2. Bei 8 Tage verdunkeltem Material zeigte sich eine Abhängigkeit der Fixierungsrate und des Fixierungsmusters von einer Vorbelichtung. Ohne Vorbelichtung war bei niedrigen Fixierungsraten eine Hemmung im Bereich der Reduktion von 3-PGS festzustellen. Die Einbaukinetik war durch eine lange lag-Phase gekennzeichnet.

3. Chloroplasten aus vorbelichtetem Material zeigten nach 1 Woche Verdunklung noch etwa 60 % der Fixierungsrate der Kontrollchloroplasten.

4. Chloroplasten aus vorbelichtetem Material besaßen nach längeren Verdunklungszeiten besonders bei hohen pH-Werten des Fixierungsmediums im Gegensatz zu den Kontrollen eine stark erhöhte Markierung von DHAP bei geringer 3-PGS-Markierung. Weitere Metabolite waren nicht signifikant verändert. Die erhöhte DHAP-Markierung wird bei voll erhaltener Reduktionskapazität als Ausdruck eines vermehrten Exports von DHAP ins Fixierungsmedium diskutiert.

5. Innerhalb von wenigen Tagen kommt es nach Überführung der verdunkelten Pflanzen in normale Kulturbedingungen zu einer Regeneration. Die Chloroplasten erreichen bei abweichenden Fixierungsmuster wieder die Fixierungsraten der Kontrollen.

   Versuche mit chloroplastenspezifischen Proteinsyntheseinhibitoren brachten Hinweise, daß bei der Regeneration eine Proteinbiosynthese im Chloroplasten stattfindet.

6. Der Einfluß langfristiger Verdunklung auf die CO_2-Fixierung ganzer Blattstücke drückte sich in einer verminderten CO_2-Fixierungsrate und einer veränderten Markierungsverteilung aus. Deutliche Unterschiede ergaben sich in einem Abfall der Markierung bei Malat und Aspartat und einem Anstieg von Metaboliten der Lichtatmung.

7. Versuche unter verschiedenen CO_2-Konzentrationen und mit Blattstücken ohne untere Epidermis gaben Hinweise, daß die erhöhte Lichtatmung der verdunkelten Pflanzen nicht durch unterschiedliche CO_2-Konzentrationen bewirkt wurde.

8. Aktivitätsbestimmungen verschiedener Enzyme während der Verdunklung geben die Möglichkeit die veränderten Muster zum Teil über einen unterschiedlichen Enzymabbau zu erklären.

9. Vergleichsweise zeigen bei geringfügig absinkender RuDP-Carboxylase vor allem die PEP-Carboxylase und die Phosphoglyceromutase einer verstärkte Inaktivierung. Die verminderte Markierung der C_4-Körper wird einerseits auf die abgefallene PEP-Carboxylase-Aktivität und andererseits auf ein vermindertes Angebot von PEP zurückgeführt.

10. Die Steigerung der Lichtatmung bei den verdunkelten Pflanzen läßt sich bei nahezu gleichbleibender Potenz zur Synthese von Glykolat durch einen eingeschränkten Umsatz von Glycin und Serin deuten.

VI Literaturverzeichnis

Andrews, T.J. und Hatch, M.D.:
Phytochem. 10, 9 (1971)

Andrews, T.J., Lorimer, G.H. und Tolbert, N.E.:
Biochem. 12, 11 (1973)

Arnon, D.I.: Plant Physiol. 24, 1 (1949)

Avron, M. und Gibbs, M.:
Plant Physiol. 53, 136 (1974)

Baldry, C.W., Bucke, C. und Coombs, J.:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 828 (1969)

Bandurski, R.S. und Greiner, C.M.:
J. Biol. Chem. 204, 781 (1953)

Bassham, J.A., Benson, A.A. und Calvin, M.:
J. Biol. Chem. 185, 781 (1950)

Bassham, J.A. und Calvin, M.:
The Path of Carbon in Photosynthesis,
Prentice-Hall, Englewood Cliffs,
New Jersey (1957)

Bassham, J.A., Kirk, M. und Jensen, R.G.:
Biochim. Biophys. Acta 153, 211 (1968)

Bassham, J.A., El-Badry, A.M., Kirk, M.R., Ottenheym, H.C.J. und Springer-Lederer, H.:
Biochim. Biophys. Acta 223, 261 (1970)

Bassham, J.A.:Science 172, 526 (1971)

Bassham, J.A., Levine, G. und Forger III, J.:
Plant Sci. Letters 2, 15 (1974)

Beevers, H.: in: Photosynthesis and Photorespiration, S. 483, M.D.Hatch, C.B. Osmond und R.O.Slatyer, Hrsg,Wiley-Interscience, New York-London-Syndney-Toronto (1971)

Benson, A.A. und Calvin, M.: Ann. Rev. Plant Physiol. 1, 25 (1950)

Berzborn, R.: Z. Naturforsch, 23b, 1096 (1968)

Buchanan, B.B. und Schürmann, P.: FEBS Letters 23, 157 (1972)

Bucke, C., Walker, D.A. und Baldry, C.W.: Biochem. J. 101, 636 (1966)

Bucke, C. und Long, S.P.: Planta 99, 199 (1971)

Chen, T.M., Brown, R.H. und Black, Jr. C.C.: Plant Physiol. 47, 199 (1971)

Coombs, J. und Baldry, C.W.: in: Proc. II. Int. Congress on Photosynth. Res., Stresa (1971) Vol. III, S. 1893, G. Forti, M. Avron und A. Melandri, Hrsg., Dr. W. Junk N.V. Publishers-The Hague (1972)

Coombs, J., Baldry, C.W. und Bucke, C.: Planta 110, 95 (1973 a)

Coombs, J., Baldry, C.W. und Brown, J.E.: Planta 110, 121 (1973 b)

Cooper, T.G., Filmer, D., Wishnick, M. und Lane, M.D.: J. Biol. Chem. 244, 1081 (1969)

Cooper, T.G. und Wood, H.G.: J. Biol. Chem. 246, 5488 (1971)

Czok, R.: in: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse Vol. 6. C. S. 657, K. Lang und E. Lenartz, Hrsg., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1966)

Dodd, W.A. und Bidwell, R.G.S.: Plant Physiol. 47, 779 (1971)

Döhler, G.: Planta 107, 33 (1972)

Downton, J. und Slatyer, R.O.: Planta 96, 1 (1971)

Duggleby, R.G. und Dennis, D.T.: Arch. Biochem. Biophys. 155, 270 (1973)

Edwards, G.E., Kanai, R. und Black, C.C.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 278 (1971)

El-Badry, A.M.: Biochim.Biophys.Acta 333, 366 (1974)

Ellis, R.J. und Hartley, M.R.: Nature New Biol. 233, 193 (1971)

Everson, R.G., Cockburn, W. und Gibbs, M.: Plant Physiol. 42, 840 (1967)

Garnier, R.V. und Latzko, E.: in: Proc, II. Int. Congress on Photosynth. Res., Stresa (1971) Vol. III, S. 1839, G. Forti, M.Avron und A. Melandri, Hrsg., Dr. W. Junk N.V. Publishers- The Hague (1972)

Gibbs, M., Latzko, E., Everson, R.G. und Cockborn,W.: in: Harvesting the Sun, S. 111 A. San Pietro, F.A.Greer und T.J. Army, Hrsg., Academic Press, New York-London (1967)

Gibbs, M.: in: Structure and Function of Chloroplasts, S. 169, M. Gibbs, Hrsg. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1971)

Goatly, M.B. und Smith, H.:
Planta 117, 67 (1974)

Goldthwaite, J.J. und Bogorad, L.:
Anal. Biochem. 41, 57 (1971)

Grant, B.R., Canvin, D.T. und Fock, H.:
in: Proc. II. Int. Congress on Photosynth. Res., Stresa (1971), Vol. III, S. 1917, G. Forti, M. Avron und A. Melandri, Hrsg., Dr. W. Junk N. V. Publishers-The Hague (1972)

Grisolia, S.:
in: Methods in Enzymology Vol. V, 236, S.P.Colowick und N.O.Kaplan, Hrsg., Academic Press, New York-London (1962)

Hatch, M.D., Slack, C.R. und Bull, T.A.:
Phytochem. 8, 697 (1969)

Hatch, M.D. und Slack, C.R.:
Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 141 (1970)

Hawker, J.S.: Phytochem. 8, 19 (1969)

Heber, U., Santarius, K.A., Hudson, M.A. und Hallier, U.W.:
Z. Naturforsch. 22b, 1189 (1967)

Heldt, H.W. und Rapley, L.:
FEBS Letters 10, 143 (1970)

Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M. und Geller, G.:
Biochim. Biophys. Acta 314, 224 (1973)

Jackson, W.A. und Volk, R.J.:
Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 385 (1970)

Jensen, R.G., Bassham, J.A.:
Proc, Nat. Acad. Sci. U.S. 56, 1095 (1966)

Jensen, R.G. und Bassham, J.A.:
Biochim. Biophys. Acta 153, 219 (1968)

Kennedy, R.A. und Laetsch, W.M.:
Planta 115, 113 (1973)

Keyssner, E. und Tauböck, K.:
in:Handbuch der Pflanzenanalyse, Vol. IV/2-III,
S. 1345, G. Klein, Hrsg., Verlag von
Julius Springer, Wien (1933)

Khanna, R. und Sinha, S.K.:
Biochem.Biophys.Res.Commun. 52, 121 (1973)

Kisaki, T., Hirabayashi, S. und Yano, N.:
Plant Cell Physiol. 14, 505 (1973)

Kohn, L.D. und Warren, W.A.:
J. Biol. Chem. 245, 3831 (1970)

Lin, D.C. und Nobel, P.S.:
Arch. Biochem. Biophys. 145, 622 (1971)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall,R.J.:
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

Manicol, P.K.:Plant Physiol. 51, 798 (1973)

Margulies, M.M.: Plant Physiol. 39, 579 (1964)

Martin, C. und Thimann, K.V.:
Plant Physiol. 49, 64 (1972)

Mazelis, M. und Vennesland, B.:
Plant Physiol. 32, 591 (1957)

McKee, H.S.:in:Encycl. Plant Physiol., Vol. VIII.
S. 516, W. Ruhland, Hrsg., Springer-
Verlag, Berlin-Heidelberg-Göttingen
(1958)

Miller, G.W. und Evans, H.J.:
Plant Physiol. 32, 346 (1957)

Miller, G.W.: Plant Physiol. 33, 199 (1958)

Moore, R.E., Springer-Lederer, H., Ottenhyem, H.C.J. und Bassham, J.A.:
Biochim. Biophys. Acta 180, 368 (1969)

Mothes, K.: Naturwissensch. 47, 337 (1960)

Müller, B.: Biochim. Biophys. Acta 205, 102 (1970)

Ogasawara, N. und Miyachi, S.:
Plant Cell Physiol. 12, 675 (1971)

Ohmann, E.: Arch. Mikrobiol. 67, 273 (1969)

Osmond, C.B., Troughton, J.H. und Goodchild, D.J.:
Z. Pflanzenphysiol. 61, 218 (1969)

Parthier, B.: Z. Naturforsch. 20b, 1191 (1965)

Peterson, L.W., Kleinkopf, G.E. und Huffaker, R.C.:
Plant Physiol. 51, 1042 (1973)

Postius, S. und Jacobi, G.:
Plant 99 222 (1971)

Postius, S.: Dissertation, Göttingen (1972 a)

Postius, S.: in: Proc. II. Int. Congress on Photosynth. Res., Stresa (1971), Vol. I. S. 739, G. Forti, M. Avron und A. Melandri, Hrsg., Dr. W. Junk N.V. Publishers-The Hague (1972 b)

Preis, J. und Kosuge, T.:
Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 433 (1970)

Rabinowitch, E.I.:
Photosynthesis and related Processes,
Vol. II, S. 1313, Interscience,
New York (1956)

Ries, E. und Metzner, H.:
in: Proc. II. Int. Congress on Photosynth.
Res., Stresa (1971), Vol. III, S. 2021,
G. Forti, M. Avron und A. Melandri,
Hrsg., Dr. W. Junk N.V. Publishers-
The Hague (1972)

Schürmann, P.:J. Chromatogr. 39, 507 (1969)

Schürmann, P., Buchanan, B.B. und Arnon, D.I.:
Biochim. Biophys. Acta 267, 104 (1972)

Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-
New York (1967)

Steup, M.: Dissertation, Göttingen (1972)

Strotmann, H.:Habilitationsschrift, Hannover (1971)

Ting, I.P.: Plant Physiol. 43, 1919 (1968)

Ting, I.P.: in: Photosynthesis and Photorespiration,
S. 169, M.D.Hatch, C.B.Osmond und
R.O.Slatyer, Hrsg., Wiley-Interscience,
New York-London-Sydney-Toronto (1971)

Ting, I.P. und Osmond, C.B.:
Plant Physiol. 51, 439 (1973 a)

Ting, I.P.und Osmond, C.B.:
Plant Physiol. 51, 448 (1973 b)

Tolbert, N.E., Oeser, A., Kisaki, T., Hageman, R.H.
und Yamazaki, R.K.:
J. Biol. Chem. 243, 5179 (1968)

Tolbert, N.E.: Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 45 (1971)

Umbreit, W.W., Burris, R.H. und Stauffer, J.F.:
Manometric Techniques, 4. Aufl. S. 18
Burgess Publishing Company, Minneapolis
(1964)

Ullrich, J. und Calvin, M.:
Biochim. Biophys. Acta 63, 1 (1962)

Walker, D.A.: Biochem. J. 92 22 (1964)

Walker, D.A. und Crofts, A.R.:
Ann. Rev. Biochem. 39, 389 (1970)

Walker, D.A.:in: Methods in Enzymology Vol.XXIII,A,
S. 211, A. San Pietro, Hrsg.,
Academic Press, New York-London (1971)

Walker, D.A.: New Phytol. 72, 209 (1973)

Willmer, C.M., Pallas, Jr. J.E. und Black, Jr. C.C.:
Plant Physiol. 52, 448 (1973)

Winkenbach, F., Grant, B.R. und Bidwell, R.G.S.:
Canad. J. Botany 50, 2535 (1972)

Yemm, E.W.: in: Plant Physiology, Vol. IV A, S. 231,
F.C.Steward, Hrsg., Academic Press,
New York-London (1965)

Zelitch, I.: Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 329 (1969)

Ziegler, H., Ziegler, I. und Schmidt-Clausen, H.-J.:
Planta 81, 181 (1968)

Zucker, M.: Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 133 (1972)

Anhang

Zusammensetzung der Enzymteste

Phosphoenol-pyruvat-Carboxylase (E.C.4.1.1.31)

Bestimmung im optischen Test

Test modifiziert nach Ting (1968)

2000	µl	0,05	M HEPES; pH 7,8
50	µl	0,5	M $MgSO_4$
50	µl	0,011	M NADH
20	µl	0,2	M $NaHCO_3$
10	µl		MDH; 1,7 mg/ml
50	µl		1 + 1 verdünnter Rohextrakt
50	µl	0,1	M PEP, Na-Salz zum Start

Ribulose-1,5-Diphosphat-Carboxylase (E.C.4.1.1.39)

Bestimmung über den Einbau von C-14 markiertem CO_2 in säurestabile Verbindungen.
Test modifiziert nach Andrews und Hatch (1971)

100 µl Reaktionsmedium
20 µl mit 0,05 M HEPES; pH 7,8 verdünnter Rohextrakt (1 Teil Rohextrakt, 2 Teile Puffer).

Die Reaktion wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen im abgedunkelten Raum durchgeführt bei 25°C. Nach 1 und 3 Minuten wurden jeweils 50 µl dem Reaktionsansatz entnommen und auf mit 1 N HCl getränkte Filterpapierstücke gespritzt. Zur Austreibung von nicht fixiertem CO_2 wurden die Filterpapiere in Szintillationszählgefäßen 6 Stunden im laufenden Abzug aufbewahrt.

Da die Reaktion sich linear zur Zeit verhielt, wurden die Einbauraten aus den Mitteln der beiden Einzelwerte berechnet.
Das Reaktionsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

0,12	M	HEPES; pH 7,8
0,012	M	$MgCl_2$
0,85	mM	RuDP
4,8	mM	DTT
24,3	mM	$NaHCO_3$ mit C-14 markiert. Die spezifische Aktivität betrug 1,6 µ Ci / µ mol HCO_3^-

Glykolsäure-Oxydase (E.C.1.1.3.1.)

Polarographische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs
Test modifiziert nach Osmond et al. (1969)

2000	µl	0,05 M HEPES; pH 7,8
500	µl	Rohextrakt
20	µl	Katalase; 20 mg/ml
50	µl	Glykolsäure, 10 mg/ml zum Start

Es wurde mit einer Clark-Elektrode der Firma Rank Brothers (England) gearbeitet. Geeicht wurde die Elektrode mit luftgesättigtem Wasser bzw. mit durch Dithionit von Sauerstoff befreitem Wasser. Vor den Aktivitätsbestimmungen wurde die Elektrode jeweils sehr gründlich gespült, um Dithionit-bedingte Fehlmessungen zu vermeiden.

Glyoxylsäure-Reduktase (E.C.1.1.1.26)

Bestimmung im optischen Test
Test modifiziert nach Osmond et al. (1969)

2000	µl	0,05 M HEPES; pH 7,8
50	µl	0,011 M NADH
50	µl	1 + 1 verdünnter Rohextrakt (mit HEPES)
50	µl	Glyoxylsäure, 10 mg/ml zum Start

3-Phosphoglycerat-Mutase (E.C.2.7.5.3)

Bestimmung im optischen Test
Test modifiziert nach Grisolia (1962)

2000	µl	0,05	M HEPES; pH 7,8
100	µl	1,0	M $MgSO_4$
100	µl	1,0	M KCl
50	µl	0,011	M NADH
50	µl	0,012	M Glycerat-2,3-diphosphat $(CHA)_5$-Salz
20	µl	0,2	M ADP
10	µl		LDH, 5 mg/ml
10	µl		Enolase, 2 mg/ml
10	µl		PK, 2 mg/ml
50	µl		1 + 1 verdünnter Rohextrakt (mit HEPES)
100	µl	0,037	M Glycerat-3-phosphat $(CAH)_3$-Salz zum Start

Enolase (Phosphopyruvat-Hydratase) (E.C.4.2.1.11)

Bestimmung im optischen Test
Test modifiziert nach Czok (1966); Miller (1958)

2000	µl	0,05	M HEPES; pH 7,8
100	µl	1,0	M $MgSO_4$
100	µl	1,0	M KCl
50	µl	0,011	M NADH
20	µl	0,2	M ADP
10	µl		LDH, 5 mg/ml
10	µl		PK, 2 mg/ml
50	µl		1+1 verdünnter Rohextrakt (mit HEPES)
50	µl	0,028	M Glycerat-2-phosphat zum Start

Pyruvat-Kinase (E.C.2.7.1.40)

Bestimmung im optischen Test
Test modifiziert nach Miller und Evans (1957)

2000 µl	0,05	M	HEPES; pH 7,8
100 µl	1,0	M	$MgSO_4$
100 µl	1,0	M	KCl
50 µl	0,011	M	NADH
50 µl	0,1	M	PEP
10 µl			LDH, 5 mg/ml
50 µl			1 + 1 verdünnter Rohextrakt (mit HEPES)
20 µl	0,2	M	ADP zum Start

Da auf Grund endogener MDH bereits eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Reaktion mit Hilfe des aus der Luft aufgenommenen CO_2 stattfindet, wurde nach der Rohextraktzugabe vor dem Start mit ADP über 2 bis 3 Minuten die PEP-Carboxylase-Rate bestimmt. Diese Rate wurde dann von der Rate, die nach der ADP-Zugabe erhalten wurde, abgezogen. Durch dieses Verfahren wurde auch gewährleistet, daß eine mögliche PEP-Phosphatase-Reaktion nicht störte.

Herrn Professor Dr. G. Jacobi
danke ich für die Anregung zu
dieser Arbeit und für deren
stetige Förderung.

Lebenslauf

6. September 1945	geboren in Weinböhla bei Dresden als Sohn des Dipl.-Chemikers Anton Krapf und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Peltner
1952 - 1956 Ostern	Besuch der Volksschule in Lispenhausen, Kreis Hersfeld/Rotenburg
1956 - 1956 Ostern Herbst	Besuch der Jakob Grimm-Schule in Rotenburg/Fulda (Gymnasium)
1956 - 1965	Besuch der Werratalschule in Heringen, Kreis Hersfeld/Rotenburg (Gymnasium)
17. Februar 1965	Ablegung der Reifeprüfung ebenda
SS 1965	Beginn des Biologiestudiums an der Philipps-Universität in Marburg
7. Mai 1971	Abschluß des Studiums in Marburg mit dem Diplom in Biologie (Hauptfach: Botanik)
SS 1971	Beginn mit der Arbeit für die vorliegende Dissertation unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Jacobi am Lehrstuhl Biochemie der Pflanze der Georg-August-Universität, Göttingen.